
**Methodische Entwicklungen zur
Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie
sowie druckabhängige Untersuchungen an
Oozyten von *Xenopus laevis* und Modellpeptiden**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSURG

vorgelegt von

Jörg Köhler

aus Erlangen

im Jahr 2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

10. Februar 2014

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Oberprieler

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Hans Robert Kalbitzer

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfram Gronwald

Drittprüfer: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Sterner

Unterschrift:

Dipl.-Phys. Jörg Köhler

"[...] I am still confused. But on a higher level."

Enrico Fermi

INHALT

1	Einleitung	6
2	Theoretische Grundlagen	8
2.1	Thermodynamische Beschreibung	8
2.1.1	Das Zweizustandsmodell	9
2.1.2	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung	10
2.1.3	Indirekte Spin-Spin Kopplung	12
2.1.4	Druckverlauf im Drucksprungexperiment	13
2.1.5	Druckabhängigkeit der Signalvolumina	14
2.2	Bestimmung der Relaxationszeiten	15
2.2.1	Spin-Gitter Relaxationszeit	16
2.2.2	Spin-Spin Relaxationszeit	16
2.2.3	Rotatorische Korrelationszeit	17
2.3	Nomenklatur der Benennung der Atome in Aminosäuren	19
3	Entwicklung automatisierter Hochdruckanlagen	20
3.1	Materialien und Methoden	21
3.1.1	Druckübertragende Leitungen und Fluide	22
3.1.2	Druckerzeugungseinheiten	22
3.1.3	Automatische Hochdruckventile	23
3.1.4	Hochdruckfeste Keramik-Zelle	24
3.1.5	Probenzusammensetzung	24
3.1.6	NMR-spektroskopische Messungen	24
3.1.7	Sensorbasierte Druckmessungen	25
3.2	Ergebnisse	25
3.2.1	Optimierung des Aufbaus der Hochdruck-Probe	26
3.2.2	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Histidin	27
3.2.3	Integriertes automatisiertes Druckregelsystem	29
3.2.4	Automatisierte Drucksprungeinrichtung	36
3.3	Diskussion der Ergebnisse	48
3.3.1	Aufbau der Hochdruckprobe	48
3.3.2	Integriertes automatisiertes Druckregelsystem	48
3.3.3	Automatisierte Drucksprungeinrichtung	49
4	Druckantworten von Modellpeptiden	52
4.1	Materialien und Methoden	53

4.1.1	Synthese der Peptide	53
4.1.2	Probenpräparation.....	54
4.1.3	NMR-spektroskopische Messungen und Datenauswertung.....	55
4.2	Ergebnisse	56
4.2.1	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung	57
4.2.2	$^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen	77
4.2.3	Korrelationsanalyse der Ergebnisse	81
4.3	Diskussion der Ergebnisse	83
4.3.1	pH-Abhängigkeit der Ergebnisse	83
4.3.2	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung	84
4.3.3	$^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen	89
5	In-vivo-Lipid-HP-NMR-Spektroskopie an Oozyten	93
5.1	Materialien und Methoden	95
5.1.1	Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	95
5.1.2	Membranspannung mittels Voltage Clamp.....	96
5.1.3	Hochdruck NMR-Spektroskopie an Oozyten.....	97
5.2	Ergebnisse	98
5.2.1	Druckabhängigkeit der Membranspannung	98
5.2.2	In-vivo-Lipid-HP-NMR-Spektroskopie.....	100
5.3	Diskussion der Ergebnisse	109
5.3.1	Druckabhängigkeit des Signalvolumens.....	109
5.3.2	Druckabhängigkeit der Relaxationszeiten.....	110
5.3.3	Interpretation der rotatorischen Korrelationszeit	111
5.3.4	Druckabhängige Vitalitätsmessungen der Oozyten.....	111
5.3.5	Resümee der In-Vivo-Lipid-HP-NMR-Spektroskopie.....	111
6	Zusammenfassung	113
7	Literaturverzeichnis	116
8	Danksagung.....	122
9	Anhang.....	124
9.1	Hochdruckanlagen	124
9.1.1	AU-Programm zur automatischen Drucksteuerung	124
9.1.2	Pulsprogramm des Drucksprungexperimentes	128
9.2	Tetrapeptide	129
9.2.1	Druckkoeffizienten von Gly1, Gly2 und Ala4.....	129

1 EINLEITUNG

Die Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie (*HP-NMR-Spektroskopie*, *High Pressure Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) ist für die Untersuchung von biochemisch aktiven Makromolekülen in nativer Umgebung eine herausragende Methode mit beachtlichen Vorteilen [Akao6, Kit13]. Die Anwendung hohen Druckes ermöglicht die direkte Manipulation thermodynamischer Gleichgewichte auf reversible Art und Weise. Durch den unmittelbaren Einfluss auf die freie Energie des Systems lassen sich konformationelle Gleichgewichte von Struktur-Ensembles verschieben und beispielsweise Faltungsprozesse an Proteinen beobachten [Inooo]. Die Möglichkeit der nahezu instantanen Applikation des Druckes auf das gesamte Probenvolumen hinweg zeichnet diese Methode gegenüber der relativ trägen Variation der Temperatur als äußeren Parameter aus. Zudem erweisen sich druckinduzierte strukturelle Änderungen an Proteinen als weitestgehend reversibel.

Es lässt sich mittels Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie nicht nur der selten biochemisch aktive Grundzustand von Makromolekülen studieren, sondern ebenso funktionell relevante, hochenergetische Konformere [Kaco6]. Auch zu einem Verständnis dynamischer Prozesse wie Polymerisierung [Mun13] oder Ligandeninteraktion [Kal13] öffnet die Kombination hoher hydrostatischer Drücke mit der Kernspinresonanzspektroskopie an Flüssigkeiten die Tür.

Der Druck als thermodynamischer Parameter beeinflusst indirekt alle Größen des NMR-Experimentes, die Änderung der chemischen Verschiebung ist aber diejenige, welche sich

mit großer Genauigkeit bestimmen lässt. Um sodann aus der beobachteten Verschiebung der Resonanzfrequenz eindeutige Rückschlüsse auf strukturelle Konformationsänderungen in Proteinen ziehen zu können, bedarf es einer Separation der Ergebnisse von intrinsischen, bereits den einzelnen Aminosäuren innewohnenden Effekten. In Kapitel 4 werden derartige Untersuchungen der Druckabhängigkeit sowohl der ^1H als auch der ^{15}N chemischen Verschiebung in Modellpeptiden behandelt. Über diese ungefalteten, gestreckten Tetrapeptide lassen sich die sogenannten *Random-Coil-Werte* (*statistisches Knäuel*) der 20 proteinogenen Aminosäuren ermitteln. Der zusätzliche Einfluss verschiedener Aminosäurereste auf deren Nachbarschaft innerhalb der Peptidkette ist mittels sequenzspezifischer Korrekturfaktoren beschreibbar. Ebenfalls in Kapitel 4 wird die druckinduzierte Änderung der $^1J_{\text{N-H}}$ -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen behandelt. Die Interaktion der N-H-Bindung mit dem sie umgebenden Wasser der Hydrationshülle führt zu starken, kollektiven Effekten.

In den biologischen Wissenschaftsdisziplinen ist der Erfolg der Kernspinresonanzspektroskopie eng verknüpft mit der Einführung mehrdimensionaler Experimente. Hierbei werden normalerweise, mittels einer geeigneten Kombination von Hochfrequenz- und Gradientenpulsen, Eigenschaften von Kernspins miteinander korreliert. Um die grundlegende, rein auf Hochfrequenzimpulsen und magnetischen Feldgradienten basierende, mehrdimensionale Spektroskopie zu erweitern, lassen sich weitere physikalische Dimensionen einführen. Hierzu eignen sich grundsätzlich viele gepulste physikalische Störungen des thermodynamischen Gleichgewichts, wie Wärme, Druck oder auch Licht. Diese initiieren entweder chemische Reaktionen oder beeinflussen ganz allgemein Strukturzustände, was zu einer messbaren Manipulation des Spinsystems führt [Kreu].

Um gepulste Druckänderungen in die Kernspinresonanzspektroskopie zu integrieren, gilt es gewisse technische Herausforderungen zu meistern. Man muss zum einen in der Lage sein, relative hohe Druckänderungen auf sehr kleinen Zeitskalen zu realisieren und zum anderen diese auch zeitlich sehr genau mit dem Pulsprogramm des Spektrometers abzustimmen. Auf die Planung sowie die Realisierung einer solchen Drucksprüngeinrichtung einerseits, aber auch auf die nötigen Apparaturen für statische Hochdruckexperimente andererseits sowie generell die dafür benötigten Materialien wird in Kapitel 3 genauer eingegangen.

Ein weiterer, sich in der Analyse von Polymerisierung oder sogar Aggregation von Proteinen manifestierender Einfluss auf das Kernspinresonanz-Signal ist die Mobilität der untersuchten Moleküle. In der hier angewandten Kernspinresonanzspektroskopie an Flüssigkeiten sinkt die Intensität des Signals signifikant mit schwindender Mobilität der zu untersuchenden Materialien. Mittels der Kompression der Probe bei steigendem Druck, lassen sich nun die rotatorischen wie translatorischen Freiheitsgrade von Fettsäureketten in Lipiden reduzieren, was über ein dazu proportional sinkendes Volumen der Resonanzlinie detektierbar wird. Diese Methode lässt sich mit der Spektroskopie an lebenden Zellen verknüpfen. Somit gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals, in-vivo-HP-NMR-Spektroskopie an Lipiden durchzuführen, was in Kapitel 5 behandelt wird.

Eine Herleitung der mathematischen Modelle, welche zur Auswertung der gewonnenen Daten unerlässlich sind, wird in Kapitel 2 gegeben. Zudem werden dort jene, in vorliegender Arbeit Anwendung gefundenen Methoden der NMR-Spektroskopie erwähnt. Eine grundlegende Einführung in die sehr etablierte Kernspinresonanzspektroskopie kann an dieser Stelle nicht gegeben werden, da jene den hier gesetzten Rahmen sprengen würde. Hierzu sei, für den interessierten Leser, beispielhaft auf einschlägige Literatur verwiesen [Hau89, Levo8, Cavo7].

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In diesem Kapitel sollen diejenigen theoretischen Grundlagen, welche für das Verständnis der vorliegenden Arbeit unerlässlich sind, erarbeitet werden. In den jeweiligen, die Ergebnisse genauer beschreibenden Kapiteln, wird auf die detaillierte Durchführung der zugehörigen Experimente sowie die Methodik der Datenauswertung genauer eingegangen werden. Allerdings sollen alle dafür benötigten, mathematischen Zusammenhänge nun aufgeführt und erklärt werden.

2.1 Thermodynamische Beschreibung

Um die Abhängigkeit der messbaren Observablen eines NMR-spektroskopischen Experiments von variablen, äußeren Parametern zu beschreiben, sind einige thermodynamische Grundlagen von Nöten. Diese sollen im nun folgenden Abschnitt erörtert werden.

2.1.1 Das Zweizustandsmodell

Das physikalisch einfachste Modell zur Beschreibung nichtlinearer Übergänge ist das Zweizustandsmodell. Es findet in der Beschreibung der meisten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Anwendung.

Der Boltzmann-Statistik folgend existieren im Zweizustandsmodell die beiden Besetzungswahrscheinlichkeiten

$$p'_{i=1,2} = \frac{N_i}{N} = \frac{1}{Z} \exp\left(\frac{-G_i(p,T)}{RT}\right) \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

mit N_i der Zahl der Teilchen im Zustand i , N der Gesamtzahl der Teilchen des Systems, Z der Zustandssumme, $G_i(p,T)$ der Gibbs-Energie des Zustands i , R der allgemeinen Gaskonstanten, T der Temperatur und p dem Druck. Das Verhältnis der Besetzungszahlen der beiden Zustände im thermodynamischen Gleichgewicht ergibt sich somit zu

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{\exp\left(\frac{-G_1(p,T)}{RT}\right)}{\exp\left(\frac{-G_2(p,T)}{RT}\right)} = \exp\left(\frac{\Delta G_{12}(p,T)}{RT}\right) \quad (\text{Gleichung 2.2}).$$

Die Differenz der Besetzungswahrscheinlichkeiten kann unter Verwendung von Gleichung 2.2, ebenfalls unter Annahme eines Gleichgewichtszustandes, wiedergegeben werden als

$$p'_2 - p'_1 = \frac{N_2 - N_1}{N_1 + N_2} = \frac{\exp\left(\frac{-\Delta G_{12}(p,T)}{RT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{-\Delta G_{12}(p,T)}{RT}\right) + 1} = \tanh\left(\frac{-\Delta G_{12}(p,T)}{2RT}\right) \quad (\text{Gleichung 2.3}).$$

Die Zustände 1 und 2 lassen sich chemisch durch ihre Gibbs-Energien G charakterisieren, deren Änderung im Umkehrpunkt der sigmoidalen Funktion verschwindet (Abbildung 2.1). Sind die Besetzungswahrscheinlichkeiten der beiden Zustände in den Sättigungsbereichen im trivialen Fall gleich eins, so weicht im Allgemeinen der Wert der Observablen y eines Experimentes erheblich davon ab. Hier sind die beiden Zustände durch die Werte y_1 und y_2 der Observablen gekennzeichnet. Der Tangens Hyperbolicus bedarf also einer Streckung b und einer Translation a entlang der Ordinate. Gleichung 2.3 ändert sich daher zu

$$y(p,T) = a + b \tanh\left(\frac{-\Delta G_{12}(p,T)}{2RT}\right) \quad (\text{Gleichung 2.4}).$$

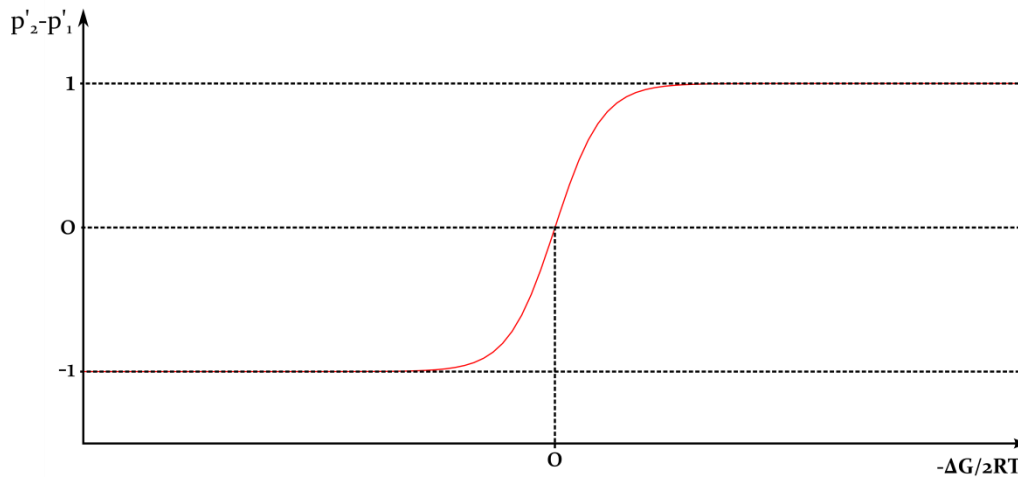


Abbildung 2.1: **Besetzungswahrscheinlichkeiten im Zweizustandsmodell.** Die Differenz der Besetzungswahrscheinlichkeiten zweier Zustände mit Boltzmann-Verteilung folgt dem Tangens Hyperbolicus (rote Linie), dessen Argument eine Funktion der Energiedifferenz der beiden Zustände darstellt (Gleichung 2.3). Im Umkehrpunkt der sigmoidalen Funktion verschwindet diese Energiedifferenz.

Wie leicht gezeigt werden kann, besitzen die beiden asymptotischen Extrema y_1 und y_2 , welche der Observablen $y(p,T)$ in Zustand 1 beziehungsweise Zustand 2 zuzuordnen sind, den einfachen Zusammenhang mit den modifizierenden Parametern a und b

$$a = \frac{1}{2}(y_1 + y_2) \quad (\text{Gleichung 2.5}) \text{ und}$$

$$b = \frac{1}{2}(y_2 - y_1) \quad (\text{Gleichung 2.6}).$$

Bedenkt man die Symmetrie des Tangens Hyperbolicus zum Ursprung, so lässt sich Gleichung 2.4 folglich notieren als

$$y(p,T) = \frac{1}{2}(y_1 + y_2) - \frac{1}{2}(y_2 - y_1) \tanh\left(\frac{\Delta G_{12}(p,T)}{2RT}\right) \quad (\text{Gleichung 2.7}).$$

2.1.2 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung

Bei gegebener Temperatur T_0 und variablem Druck p hängt die beobachtete chemische Verschiebung δ generell von der Austausch-Korrelationszeit τ_{12} und dem Unterschied der chemischen Verschiebungen $\Delta\omega_{12}$ der Zustände 1 und 2 ab. In vielen Fällen ist anzunehmen,

dass sich beide Zustände relativ zur NMR-Zeitskala in schnellem Austausch befinden, wobei gilt [Koe12]

$$|\Delta\omega_{12}\tau_{12}| \ll 1 \quad (\text{Gleichung 2.8}).$$

Unter Annahme des schnellen Austausches ergibt sich die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung mittels Gleichung 2.7 zu

$$\delta(p) = \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) - \frac{1}{2}(\delta_2 - \delta_1) \tanh\left(\frac{\Delta G_{12}(p)}{2RT_0}\right) \quad (\text{Gleichung 2.9}).$$

Die gemessene chemische Verschiebung bei gegebenem Druck p ist der populationsgewichtete Mittelwert der Extremwerte δ_1 und δ_2 . Die Besetzungswahrscheinlichkeiten der beiden Zustände lassen sich mittels Druckänderung variieren, was sich in einer veränderlichen, gemittelten chemischen Verschiebung manifestiert.

Die globale, sigmoidale Gleichung 2.9 lässt sich für kleine Druckänderungen um den Punkt p_0 mittels einer Taylor-Entwicklung in ein Polynom zweiter Ordnung überführen

$$\delta(p) = B_0 + B_1(p - p_0) + B_2(p - p_0)^2 + \dots \quad (\text{Gleichung 2.10}).$$

Mit $\Delta G^0 = \Delta G(T_0, p_0)$ sind hier die Koeffizienten B_0 , B_1 und B_2 gegeben durch

$$B_0 = \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) - \frac{1}{2}(\delta_2 - \delta_1) \tanh\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right) \quad (\text{Gleichung 2.11a}),$$

$$B_1 = -\frac{(\delta_2 - \delta_1)}{4RT_0} \frac{\partial \Delta G(p_0)}{\partial p} \left(1 - \tanh^2\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right)\right) \quad (\text{Gleichung 2.11b}) \text{ und}$$

$$B_2 = -\frac{(\delta_2 - \delta_1)}{8RT_0} \left(1 - \tanh^2\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right)\right) \left(\frac{\partial^2 \Delta G(p_0)}{\partial p^2} - \frac{1}{RT_0} \left(\frac{\partial \Delta G(p_0)}{\partial p}\right)^2 \tanh\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right) \right) \quad (\text{Gleichung 2.11c}).$$

Die kleinen, druckabhängigen Änderungen der chemischen Verschiebung $\delta(p)$ in den untersuchten Modellpeptiden können zufriedenstellend mit der Taylor Näherung zweiter Ordnung (Gleichung 2.10) beschrieben werden

$$\delta(p) = \delta_0(p_0) + B_1(p - p_0) + B_2(p - p_0)^2 \quad (\text{Gleichung 2.12}),$$

wobei p den Druck, δ_0 die chemische Verschiebung bei einem atmosphärischen Druck von 0,1 MPa, somit den Koeffizienten nullter Ordnung, sowie B_1 und B_2 die Druckkoeffizienten erster und zweiter Ordnung aus den Gleichungen 2.11 darstellen. In erster Näherung verhält sich die Änderung der chemischen Verschiebung zwar linear mit dem Druck, sie weist aber ebenfalls eine signifikante, wenn auch sehr kleine Nichtlinearität auf.

2.1.3 Indirekte Spin-Spin Kopplung

Im Falle der relativ großen, stark nichtlinearen Änderungen der $^1J_{N-H}$ Kopplungskonstante der indirekten Spin-Spin-Wechselwirkung in den Rückgrat Amidgruppen genügt die in Abschnitt 2.1.2 eingeführte Näherung für lediglich kleine Änderungen der Observablen nicht einer adäquaten Beschreibung der Effekte. Ausgehend von der globalen Gleichung 2.7 erhält man für die druckabhängigen Kopplungskonstanten J_1 und J_2 als Charakterisierung der Zustände 1 und 2 den Zusammenhang

$$J(p) = \frac{1}{2}(J_1 + J_2) - \frac{1}{2}(J_2 - J_1) \tanh\left(\frac{\Delta G_{12}(p)}{2RT_0}\right) \quad (\text{Gleichung 2.13}).$$

Die Änderung der druckabhängigen Gibbs-Energie $\Delta G_{12}(p)$ ist definiert als [Her98]

$$\Delta G_{12}(p) = \Delta G_{12}^0(p_0) + \Delta V_{12}^0(p - p_0) - \frac{1}{2} \Delta \beta_{12}^0(p - p_0)^2 \quad (\text{Gleichung 2.14}),$$

wobei ΔV_{12}^0 die Änderung des partiellen molaren Volumens zwischen Zustand 1 und 2 darstellt und $\Delta \beta_{12}^0$ die Änderung des partiellen molaren Kompressibilitätsfaktors, welcher das Produkt aus isothermaler Kompressibilität und dem Volumen selbst repräsentiert.

Im Falle der $^1J_{N-H}$ Kopplungskonstanten kann, aufgrund der hier auftretenden großen Messabweichungen, das quadratische Glied vernachlässigt werden. Somit ergibt sich aus den Gleichungen 2.13 und 2.14 nach einfacher Umformung

$$J(p) = J_1 + \frac{J_2 - J_1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G_{12}^0(p_0) + \Delta V_{12}^0(p - p_0)}{RT_0}\right)} \quad (\text{Gleichung 2.15}).$$

Für den verallgemeinerten Fall von N Zuständen in schnellem Austausch (Gleichung 2.8) ergibt sich $J(p)$ zu [Koe14]

$$J(p) = \frac{\sum_{i=1}^N J_i \exp\left(-\frac{\Delta G_{li}}{RT_0}\right)}{\sum_{i=1}^N \exp\left(-\frac{\Delta G_{li}}{RT_0}\right)} \quad (\text{Gleichung 2.16})$$

und somit für drei Zustände zu

$$J(p) = \frac{J_1 + J_2 \exp\left(-\frac{\Delta G_{12}^0(p_0) + \Delta V_{12}^0(p - p_0)}{RT_0}\right) + J_3 \exp\left(-\frac{\Delta G_{13}^0(p_0) + \Delta V_{13}^0(p - p_0)}{RT_0}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_{12}^0(p_0) + \Delta V_{12}^0(p - p_0)}{RT_0}\right) + \exp\left(-\frac{\Delta G_{13}^0(p_0) + \Delta V_{13}^0(p - p_0)}{RT_0}\right)} \quad (\text{Gleichung 2.17}).$$

2.1.4 Druckverlauf im Drucksprungexperiment

Der Verlauf des Druckwertes während des Drucksprungexperimentes zwischen zwei unterschiedlichen Druckniveaus lässt sich trivialer Weise ebenfalls mit einem Zweizustandsmodell assoziieren. Allerdings bleibt zu bemerken, dass den Zuständen hierbei weder eine Besetzung noch eine Übergangswahrscheinlichkeit im Sinne der Boltzmann-Statistik zuzuordnen ist. Aus rein phänomenologischer Sicht aber hat sich die Verwendung eines Tangens Hyperbolicus bewährt, um aus den gemessenen Daten die Zeitkonstante der Druckänderung zu extrahieren. Somit lässt sich festlegen

$$p(t) = \frac{1}{2}(p_1 + p_2) - \frac{1}{2}(p_2 - p_1) \tanh\left(\frac{t - t_0}{dt}\right) \quad (\text{Gleichung 2.18}).$$

Wie in Kapitel 3 detaillierter erörtert werden wird, bedient man sich der druckinduzierten Änderung des pK-Wertes der Histidin Seitenkette, um über die daraus resultierende wie messbare Änderung der chemischen Verschiebung Rückschlüsse auf den aktuellen Wert des Druckes innerhalb der Probe zu ziehen. Im Falle der H^{el} -Resonanz von Histidin, welche aufgrund ihrer stärkeren Druckabhängigkeit im Drucksprungexperiment benutzt wird, beträgt der quadratischen Term in Gleichung 2.12 bei einer Druckdifferenz von 100 MPa lediglich 10 % des linearen Terms (Tabelle 3.2). Somit ist für Drucksprünge, welche kleiner als 100 MPa sind, in erster Näherung das quadratische Glied in Gleichung 2.12 vernachlässigbar

und es folgt mit $p_o = p_i$ und $p = p(t)$ (Gleichung 2.18) für die zeitabhängige chemische Verschiebung

$$\delta(t) = \delta_i - \frac{B_i}{2}(p_2 - p_i) \tanh\left(\frac{t - t_0}{dt}\right) \quad (\text{Gleichung 2.19}).$$

Hierbei ist δ_i die chemische Verschiebung bei Druck p_i und B_i der lineare Druckkoeffizient aus Tabelle 3.2. Ferner stellt p_2 das zweite Druckniveau im Drucksprungexperiment dar, t die Zeit und t_0 die Mitte der Druckflanke, wobei dt ein Maß für die zeitliche Änderung ist.

2.1.5 Druckabhängigkeit der Signalvolumina

Der druckabhängigen Änderung der Signalvolumina von Lipiden, welche in Kapitel 5 vorgestellt wird, liegt prinzipiell ebenfalls ein Zweizustandsmodell zugrunde; es sind dies die beiden Zustände *sichtbar* und *unsichtbar*. Für eine exakte thermodynamische Beschreibung der Effekte bedarf es aber einer Erweiterung. Wie auch die Analyse der temperaturabhängigen Effekte in Lipoproteinen [Bau11] können die druckabhängigen Signalintegrale nur mit einem Drei-Kompartimente-Modell erklärt werden. Kompartiment U enthält nur Signale, welche für eine Detektion zu stark verbreitert und daher im NMR-spektroskopischen Experiment immer unsichtbar sind. Kompartiment S besteht nur aus Signalen, die aufgrund ihrer Mobilität, unabhängig vom Druck, stets sichtbar sind. Die Lipide in Kompartiment P hingegen sind in einen Phasenübergang involviert, was zu einer starken Abhängigkeit der Signalvolumina vom Druck führt. Nach dem Phasenübergang sind diese Signale wegen hier anzunehmendem langsamen Austausch ebenfalls unsichtbar im Experiment. Allen dreien Kompartimenten ist eine Protonenkonzentration c zuzuordnen, welche für die sichtbaren Fraktionen proportional zum druckabhängigen Signalvolumen $V(p)$ ist

$$V(p) = a(c_S + c_P^S) \quad (\text{Gleichung 2.20}),$$

wobei die Proportionalitätskonstante a apparative Parameter enthält. c_S ist die Konzentration des stets sichtbaren Kompartiments, c_P^S die noch sichtbare des Kompartiments des Phasenübergangs. Die Gleichgewichtskonstante K des in den Phasenübergang involvierten Kompartimentes ist sowohl durch das Verhältnis der Konzentrationen der hierin sichtbaren und unsichtbaren Fraktionen, als auch durch den Boltzmann-Faktor gegeben

$$K = \frac{c_P^U}{c_P^S} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{12}(p)}{RT}\right) \quad (\text{Gleichung 2.21}).$$

Mit

$$c_P = c_P^U + c_P^S \quad (\text{Gleichung 2.22})$$

folgt daraus für das druckabhängige Signalvolumen

$$V(p) = a \left(c_S + \frac{1}{1+K} c_P \right) \quad (\text{Gleichung 2.23}).$$

Um die apparative Konstante a zu eliminieren, lassen sich die relativen Änderungen der Signalintegrale normiert auf den Startwert bei 0,1 MPa betrachten. Aus Gleichung 2.23 folgt somit

$$\frac{V(p)}{V(p_0)} = \frac{1 + \frac{1}{1+K(p)} \cdot \frac{c_P}{c_S}}{1 + \frac{1}{1+K(p_0)} \cdot \frac{c_P}{c_S}} \quad (\text{Gleichung 2.24})$$

und daraus mittels Gleichungen 2.14 und 2.21

$$\frac{V(p)}{V(p_0)} = \frac{1 + \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{1}{RT} \left(-\Delta G^0(p_0) - \Delta V^0(p - p_0) + \frac{1}{2} \Delta \beta^0 (p - p_0)^2 \right)\right)} \cdot \frac{c_P}{c_S}}{1 + \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{1}{RT} \left(-\Delta G^0(p_0) \right)\right)} \cdot \frac{c_P}{c_S}} \quad (\text{Gleichung 2.25})$$

2.2 Bestimmung der Relaxationszeiten

Um Aussagen über die molekulare Mobilität, oder auch der damit verbunden Wechselwirkung der Teilchen eines thermodynamischen Ensembles untereinander, treffen zu können, ist die Bestimmung der NMR-Relaxationszeiten ein adäquates Mittel. Diese sollen nun grundlegend eingeführt werden. Zusätzlich wird im folgenden Abschnitt ein Zusammenhang zwischen der rotatorischen Korrelationszeit und den Relaxationsraten hergeleitet.

2.2.1 Spin-Gitter Relaxationszeit

Die longitudinale oder auch Spin-Gitter Relaxationszeit T_1 lässt sich in der NMR-Spektroskopie mit Hilfe des *Inversion-Recovery-Experimentes* bestimmen. Hierbei wird die

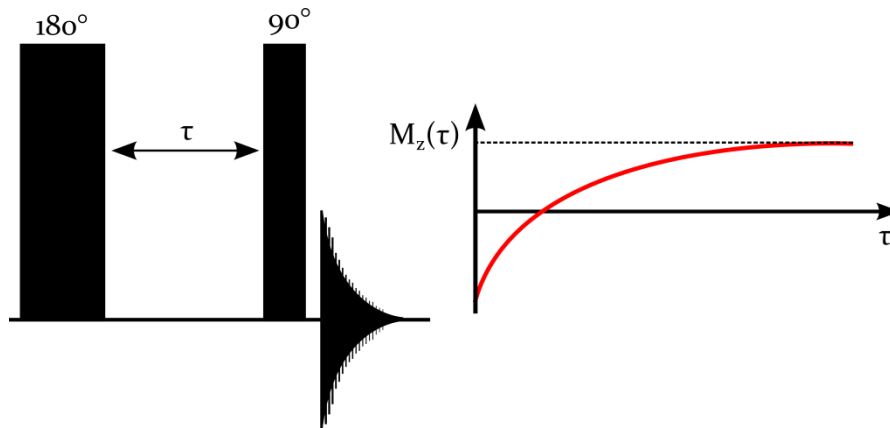


Abbildung 2.2: **Inversion-Recovery-Experiment.** Links: Pulsfolge aus 180° -und 90° -Impulsen mit Wartezeit τ . Rechts: Verlauf der gemessenen Amplitude des Signals in Abhängigkeit der Wartezeit τ .

Gleichgewichtsmagnetisierung invertiert, ergo mittels eines 180° -Impulses aus der (z)-Richtung in die ($-z$)-Richtung gebracht. Von dort relaxiert diese wieder in das thermische Gleichgewicht (Abbildung 2.2). Da beide (z)-Magnetisierungen nicht detektierbar sind, müssen diese mittels eines 90° -Impulses in eine messbare (xy)-Magnetisierung überführt werden. Zwischen beiden Impulsen befindet sich eine variable Wartezeit τ . Unmittelbar nach dem Inversionsimpuls erzeugt der 90° -Impuls ein maximal negatives Signal in ($-x$)-Richtung, für beliebig lange Wartezeiten τ ein maximal positives in (x)-Richtung. Zwischen diesen Extrema beschreibt die Amplitude des Signals eine exponentiell sättigend verlaufende Kurve. Aus der Lösung der Blochschen Gleichungen für M_z ergibt sich die gesuchte Zeitkonstante T_1 zu [Hau89]:

$$M_z(\tau) = M_0 - (M_0 - M_z(0)) \exp\left(\frac{-\tau}{T_1}\right) \quad (\text{Gleichung 2.26})$$

2.2.2 Spin-Spin Relaxationszeit

Die transversale oder Spin-Spin Relaxationszeit T_2 wird mittels einer CPMG-Pulssequenz (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) bestimmt. Diese stellt eine modifizierte Spin-Echo Pulssequenz dar, bei der die dephasierende Magnetisierung mittels vieler 180° -Impulse periodisch rephasiert wird (Abbildung 2.3). Dies führt zu einzeln aufnehmbaren, zeitlich versetzten Spin-

Echos, welche in Amplitude abnehmen. Der Verlust der Signalintensität ist auf die Spin-Spin-Relaxation zurückzuführen und wird von einer exponentiell abfallenden Envelope beschrieben, deren Zeitkonstante die T_2 -Zeit ist. Hier ergibt sich die zeitabhängige Signalamplitude zu [Levo8]:

$$A(\tau) = A_0 \exp\left(\frac{-\tau}{T_2}\right) \quad (\text{Gleichung 2.27})$$

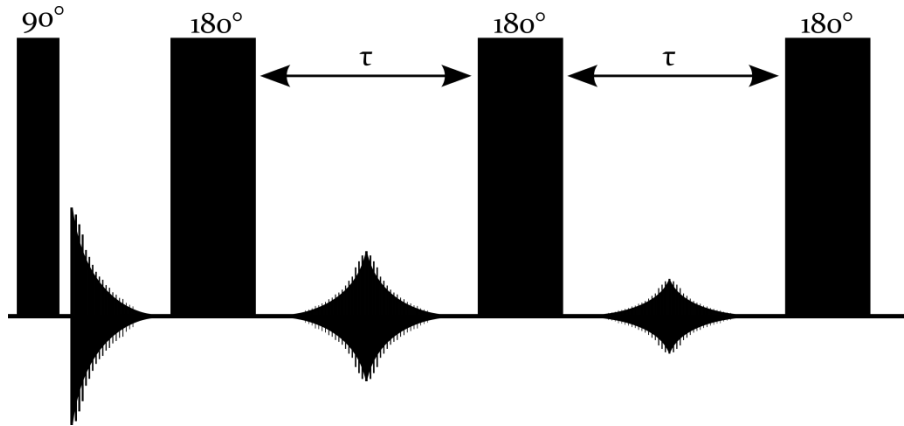


Abbildung 2.3: **CPMG-Spin-Echo-Experiment.** Pulsfolge aus periodischen 180° -Impulsen mit Wartezeit τ . Dazwischen treten in Amplitude exponentiell abfallende Spin-Echos auf.

2.2.3 Rotatorische Korrelationszeit

Als die rotatorische Korrelationszeit τ_{rot} bezeichnet man in der Thermodynamik jene Zeit, die ein Objekt im Durchschnitt benötigt, sich um 1 rad zu drehen. Sie leitet sich aus der *Stokes-Einstein-Beziehung* ab und ist definiert als [Hau89]:

$$\tau_{rot} = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT} \quad (\text{Gleichung 2.28})$$

wobei η die Viskosität der Umgebung, a der effektive Radius des Komplexes, k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur ist.

Der sogenannte *model-free-approach* nach Giovanni Lipari und Attila Szabo [Lip82] präsentiert einen mathematischen Zusammenhang zwischen den NMR-spektroskopischen Relaxationsraten und der rotatorischen Korrelationszeit. Ist die Relaxation vornehmlich auf dipolare Wechselwirkung zweier Kerne A und B mit den Resonanzfrequenzen ω_A und ω_B zurückzuführen, so ergeben sich die inversen Relaxationszeiten in Abhängigkeit zur spektralen Dichte J zu

$$\frac{1}{T_1} = K(J(\omega_A - \omega_B) + 3J(\omega_B) + 6J(\omega_A + \omega_B)) \quad (\text{Gleichung 2.29}) \text{ und}$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{K}{2}(J(0) + J(\omega_A - \omega_B) + 3J(\omega_B) + 6J(\omega_A) + 6J(\omega_A + \omega_B)) \quad (\text{Gleichung 2.30}),$$

wobei gilt

$$K = \frac{\hbar^2 \gamma_A^2 \gamma_B^2}{4r_{AR}^6} \quad (\text{Gleichung 2.31}).$$

Gleichung 2.31 ist der Quotient aus den Quadraten des Planckschen Wirkungsquantums dividiert durch 2π sowie den gyromagnetischen Verhältnissen der beiden Kerne und der sechsten Potenz ihres Abstandes.

Für den vereinfachenden Fall nur isotroper Diffusion ergibt sich die spektrale Dichte in den Gleichungen 2.29 und 2.30 zu

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \frac{S^2 \tau_{rot}}{1 + (\omega \tau_{rot})^2} \quad (\text{Gleichung 2.32}),$$

mit dem Maß der räumlichen Einschränkung der Bewegung S .

Beschränkt man die Betrachtung auf homonukleare, dipolare Wechselwirkung zweier Protonen, so gilt die Näherung

$$\omega_A \approx \omega_B \approx \omega \quad (\text{Gleichung 2.33}).$$

Dadurch vereinfachen sich die Gleichungen 2.29 und 2.30 [Hau89]. Unter Verwendung von Gleichung 2.32 ergibt sich ihr Quotient aufgelöst nach τ_{rot} zu

$$\tau_{rot} = \pm \sqrt{\frac{1}{4\omega^2} \left[\left(-\frac{27}{8} + \frac{T_1}{T_2} \pm \frac{1}{2} \sqrt{4 \left(\frac{27}{8} - \frac{T_1}{T_2} \right)^2 + 8} \right) - 1 \right]} \quad (\text{Gleichung 2.34}).$$

Da eine negative Korrelationszeit physikalisch unsinnig ist, ist die positive äußere Wurzel zu verwenden.

2.3 Nomenklatur der Benennung der Atome in Aminosäuren

Alle Benennungen von Atomen in Aminosäuren in vorliegender Arbeit sind konform mit den Richtlinien der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und beziehen sich auf [Mar98] (Abbildung 2.4).

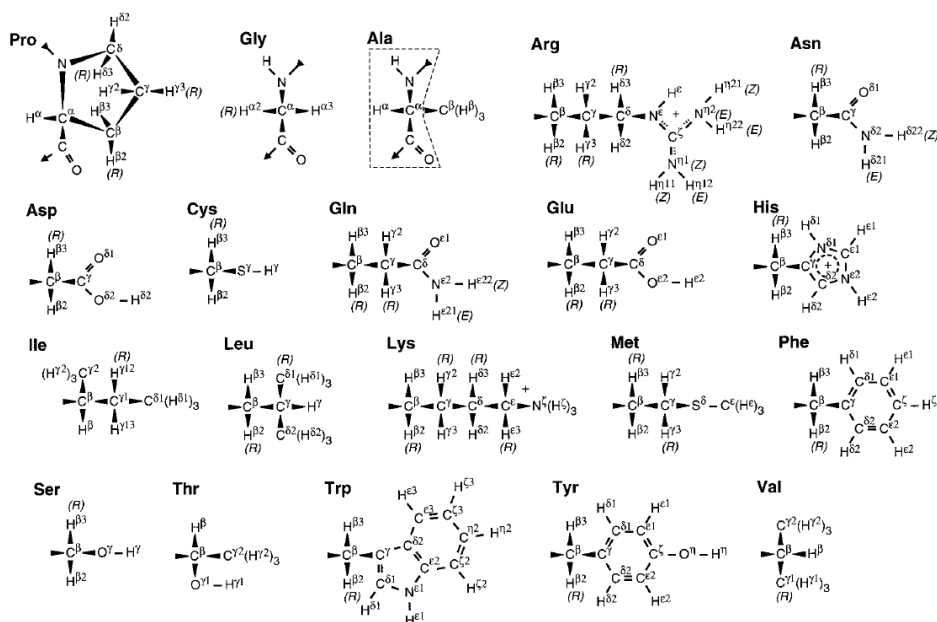


Abbildung 2.4: **Kanonische proteinogene Aminosäuren.** IUPAC-konforme Nomenklatur der Benennung der Atome in Aminosäuren nach [Mar98].

3 ENTWICKLUNG AUTOMATISierter HOCHDRUCKANLAGEN

Prinzipiell existieren zwei technisch unterschiedliche Möglichkeiten, Kernspinresonanzspektroskopie unter hohen hydrostatischen Drücken durchzuführen. Diese werden als die Jonas- und die Yamada-Methode bezeichnet. Bei erstgenannter wird der gesamte Probenkopf des Spektrometers druckdicht abgeschlossen und mit Druck beaufschlagt, bei letztgenannter lediglich das die Probe enthaltende Gefäß. Der Vorteil der Yamada-Methode [Yam74] ist die Verwendung handelsüblicher Probenköpfe, welche sich durch größere Präzision und damit einhergehend durch eine höhere Empfindlichkeit auszeichnen, als dies bei selbstgebauten Apparaturen erreichbar wäre. Ihr anfänglicher Nachteil bestand in der geringen Verfügbarkeit druckstabiler, für die NMR-Spektroskopie tauglicher Probengefäße. Daher kommt geschichtlich der Jonas-Methode die Vorreiterrolle zu. Bereits 1971 führte die Gruppe um J. Jonas an der University of Illinois mit ihrem mittels Titan gekapselten Probenkopf NMR-Spektroskopie-Experimente bei 60 MHz und bis zu 250 MPa durch [Jon71]. Der Druckbereich und die Sensitivität sowie die Auflösung ließen sich in den folgenden Jahren noch beachtlich steigern [Bal98]. Trotzdem können auch diese Weiterentwicklungen mit dem aktuellen Stand der Technik handelsüblicher Probenköpfe nicht konkurrieren. Es sei hier ganz speziell auf die Einführung kryogener Detektionsspulen verwiesen, welche unter großem technischen Aufwand hochauflösende Spektroskopie erst ermöglichen. Über die Entwicklung von druckdichten Kapillaren aus Saphir-, Quarz- und Borsilikat-Gläsern bis

hin zu hochfesten Keramiken [Bec10] setzte sich letztendlich die auch hier verwendete Yamada-Methode durch.

Hierbei wird ein druckfestes Probenröhrchen über Hochdruckleitungen mit einer Druckerzeugungseinheit außerhalb des Spektrometers verbunden. Ist diese Pumpe manuell betrieben, so muss der Experimentator nach jedem Druckwert per Hand das nächste Niveau einstellen. Eine automatische Apparatur würde die Zeiteffizienz eines damit ausgestatteten Labors deutlich erhöhen. Zudem könnten minimale Undichtigkeiten in den Zuleitungen von einer automatisierten Apparatur kontinuierlich kompensiert werden.

Beschränkt man sich auf langsame Änderungen des statischen Druckes, so lassen sich zwar die Energielandschaften thermodynamischer Systeme präzise untersuchen, dynamische Prozesse aber nur auf der Skala von Minuten bis Tagen zeitaufgelöst darstellen. Desweiteren ist es nicht möglich, einen Drucksprung direkt in die Pulssequenz zu integrieren [Kito2]. Die einzige Möglichkeit, eine bessere Zeitauflösung zu erreichen, ist die Entwicklung eines vom NMR-Spektrometer gesteuerten Drucksprungsystems. Eine solche Anlage wurde erstmals 2002 vorgestellt [Arno2a]. Sie war in der Lage, einen Drucksprung von einem definierten Niveau auf atmosphärischen Druck oder in die andere Richtung zu erzeugen [Kren1]. Allerdings gestaltete sich die Handhabung dieser Anlage als wenig benutzerfreundlich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nun zwei voneinander unabhängige Ziele formuliert, um zum einen die Zeiteffizienz bei statischen Hochdruckmessungen zu erhöhen und zum anderen die Möglichkeiten schneller Druckänderungen auszubauen. Diese beiden Ziele lauten wie folgt:

- Entwicklung eines in die Steuerung des NMR-Spektrometers integrierten, automatisierten Druckregelsystems für hochauflösende Experimente unter statischen Drücken
- Entwicklung einer Drucksprungeinrichtung, welche schnelle, zeitlich abgestimmte Druckänderungen zwischen zwei beliebigen Niveaus zu erzeugen in der Lage ist

3.1 Materialien und Methoden

Die für die Entwicklung sowohl des automatisierten Druckregelsystems für statische Hochdruckmessungen als auch der Drucksprungeinrichtung für dynamische Untersuchungen benötigten Komponenten werden im Folgenden spezifiziert. Desweiteren wird auf die Methodik der Datenerhebung genauer eingegangen werden.

3.1.1 Druckübertragende Leitungen und Fluide

Die Hochdruckleitungen sind kaltgezogene, nahtlose, amagnetische, nicht getemperte Edelstahlrohre mit drei verschiedenen Bemaßungen. Diese sind mit 1/8" Außendurchmesser und 0,020" Innendurchmesser sowie 1/4" Außendurchmesser und 0,083" Innendurchmesser und 9/16" Außendurchmesser und einem Innendurchmesser von 3/16" (*HiP - High Pressure Equipment Company*, Linden, PA, USA) anzugeben. Der maximal zulässige Druck dieser Komponenten liegt bei 400 MPa.

Als Druckfluid fungierte zu Beginn des Projektes Methylcyclohexan, welches im Verlauf der vorliegenden Arbeit mit de-ionisiertem Wasser getauscht wurde. Ursächlich für diesen aufwändigen Tausch des Druckfluides war zum einen die leichte Entflammbarkeit sowie zum anderen die gesundheitsgefährdende Wirkung von Methylcyclohexan. Nach intensiven Tests konnte von der Korrosionsbeständigkeit der Gesamtanlage ausgegangen werden und sie mit entgastem Reinstwasser gefüllt werden.

3.1.2 Druckerzeugungseinheiten

Es existieren diverse Möglichkeiten, hohe hydrostatische Drücke zu erzeugen. In den Laboratorien des Lehrstuhls für Biophysik finden grundsätzlich zwei Methoden dafür ihre Anwendung, welche hier erläutert werden sollen.

3.1.2.1 Manuelle Druckbänke

Sowohl das 500-MHz- als auch das 800-MHz-NMR-Spektrometer (jeweils *Avance* Serie, *Bruker Biospin GmbH*, Rheinstetten, Deutschland) verfügen über eine separate, in die jeweilige Druckanlage integrierte, handbetriebene Druckbank. Bei diesen Druckerzeugern wird manuell, mittels einer zu drehenden Spindelpresse, über ein Trapezgewinde ein Kolben in einen mit Druckfluid gefüllten Hohlzylinder gepresst. Die Druckmessung erfolgt über ein *Bourdon*-Manometer mit einem Messbereich von 0 MPa bis 400 MPa und der Genauigkeitsklasse 0,1 entsprechend einem Messfehler von $\pm 0,6$ MPa [Arno2a]. Über mit Handkurbeln betriebene Nadelventile (*HiP - High Pressure Equipment Company*, Linden, PA, USA) lässt sich die eigentliche Druckerzeugungseinheit vom Rest der Anlage separieren, was zu höherer Konstanz des Druckes auch über lange Messungen hinweg führt. Ursächlich für eventuelle Druckverluste sind kleinste Leckraten innerhalb des Hohlzylinders. Die einfache Handhabung sowie die geringen Anschaffungs- und Wartungskosten sind als Vorteile der manuellen Druckbänke zu nennen. Ihr Nachteil ist im geringen Automatisierungsgrad zu finden, welcher die Anwesenheit des Experimentators nach jeder Messreihe erforderlich macht. Dies führt bisweilen zu Standzeiten der Anlagen über Nacht. Desweiteren lassen sich minimale Druckverluste nicht automatisch kompensieren, was speziell bei lang andauernden Experimenten unter höchsten Drücken zu einer Verschiebung der untersuchten Parameter führen kann.

3.1.2.2 Automatische Druckgeneratoren

Die Generierung hoher Drücke wird maschinell mittels handelsüblicher Gas-zu-Flüssigkeits-Druck-Verstärker realisiert. Hierbei wirkt ein elektronisch geregelter Gasdruck von bis zu maximal 0,8 MPa auf einen Kolben großen Durchmessers. Dieser treibt analog zur manuellen Druckbank einen Kolben kleinen Durchmessers in einen Hohlzylinder. Somit ergibt sich ein bauartbedingtes, festes Übersetzungsverhältnis des pneumatischen Eingangsniederdruckes zum hydraulischen Ausgangshochdruck, resultierend nur aus dem Verhältnis der Flächen der beiden Kolben.

Für die Neuentwicklung des automatisierten Druckregelsystems fand als Druckerzeugungseinheit ein *Barocyler HUB440* (*PBI - Pressure BioSciences Inc.*, South Easton, MA, USA) Verwendung. Standardmäßig verfügt dieses Gerät über eine *Universal Serial Bus* Schnittstelle (*USB*), mittels derer es mit einem Steuerrechner verbunden ist. Auf diesem Steuerrechner überwacht ein mitgeliefertes Programm alle Funktionen der Druckerzeugungseinheit und gewährleistet über einen Regelkreis die Konstanz des Druckes.

In die ebenfalls neuentwickelte Drucksprungeinrichtung wurde zur Druckgeneration ein größerer Gas-zu-Flüssigkeitsdruck-Verstärker (*PTG - Pressure Technology Gesellschaft für Hochdrucktechnik mbH*, Frankfurt, Deutschland) integriert. Unterschiede zum *Barocyler HUB440* bestehen im Fehlen einer Rechnerschnittstelle sowie im Vorhandensein eines größeren Pumpvolumens. Dieses größere Volumen ist nötig, um die später beschriebenen Reservoirleitungen mit genügend hohen Drücken zu beaufschlagen. Über ein elektropneumatisches Eingangsventil lässt sich bei diesem Gerät der Ausgangsdruck direkt elektronisch regeln.

3.1.3 Automatische Hochdruckventile

Um in der Drucksprungeinrichtung elektronisch gesteuerte Ventilschaltungen zu ermöglichen, kommen federlose Nadelventile vom Typ *Remarco (HiP - High Pressure Equipment Company, Linden, PA, USA)* mit magnetopneumatisch regeltem Diaphragma-Stößel-Trieb für sowohl den Öffnungs- als auch den Schließvorgang zum Einsatz. Diese Bauart wird als *air-to-open/air-to-close* bezeichnet. Durch Schalten eines elektromagnetischen, pneumatischen Ventils wird bei diesen Bauteilen wechselweise eine Kammer mit dem Steuergasdruck von 0,5 MPa beaufschlagt, welcher letztendlich über ein Diaphragma und einen damit verbundenen Stößel die Ventilnadel aus dem Ventilkörper zieht oder diese hinein treibt. Zusätzlich findet ein spezielles Ventil kleiner Bauart mit niedrigem Nadelhub Verwendung (*PBI - Pressure BioSciences Inc.*, South Easton, MA, USA). Dieses wird von einer Feder geschlossen und in analoger Weise zu den oben beschriebenen Ventilen mittels Luftdruck (0,5 MPa) geöffnet. Diese Bauart wird auch als *air-to-open/spring-to-close* bezeichnet.

3.1.4 Hochdruckfeste Keramik-Zelle

Herzstück der hier entwickelten Hochdruckanlagen für NMR-Spektroskopie-Experimente ist eine Keramik-Zelle aus Aluminium-Zirkoniumdioxid (*Daedalus Innovations LLC*, Aston, PA, USA), welche die wässrige Probe beinhaltet und einem Druck von bis zu 250 MPa in einem Temperaturbereich von 278 K bis 373 K standhalten kann. Mit einem Außendurchmesser von 5 mm kann die Zelle in handelsüblichen Probenköpfen zum Einsatz kommen. Der Innendurchmesser von 3 mm garantiert aufgrund des damit verbundenen großen Probenvolumens ein genügend hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, um auch verdünnte Proteinlösungen unterhalb einer Konzentration von 100 μM noch exakt zu vermessen. Über ihren oberen Rand, welcher einen größeren Außendurchmesser aufweist, ist die Zelle mit einem nur äußerst schwach magnetisierbaren Messing-Autoklaven verbunden (Abbildung 3.1).

3.1.5 Probenzusammensetzung

Zur Validierung der Funktionsfähigkeit der neuentwickelten Druckanlagen wurden Histidin enthaltende Proben verwendet. Aufgrund der Druckabhängigkeit des pK-Wertes der Histidin Seitenkette verändert sich mit steigendem Druck die chemische Verschiebung. Da diese sehr präzise zu messen ist, gilt Histidin als interne Drucksonde.

Für das automatisierte Druckregelsystem enthielt die Probe 10 mM Histidin, 0,1 mM 4,4-Dimethyl-4-Silapentan-Sulfon-Säure (DSS) als internem Standard zur Referenzierung der chemischen Verschiebung sowie 10 % D_2O und 90 % H_2O .

Im Falle der Drucksprungeinrichtung wurde eine höher konzentrierte Probe verwendet, um die Akquisitionszeit der Daten zu verkürzen und dadurch die zeitliche Auflösung zu verbessern. Diese Probe enthielt 100 mM Histidin und 0,1 mM DSS als internem Standard. Durch die Verwendung von 90 % D_2O und 10 % H_2O sollte zudem das Signal des Wassers reduziert werden.

Der pH-Wert wurde bei beiden Proben durch Zugabe adäquater Mengen von HCl und NaOH auf 7,0 eingestellt und mit einer *Hamilton* Spintrode an einem *Beckman Coulter* pH-Meter überprüft.

3.1.6 NMR-spektroskopische Messungen

Die NMR-spektroskopischen Messungen mit der Drucksprungeinrichtung wurden an einem 500-MHz-NMR-Spektrometer (*Avance* Serie, *Bruker Biospin GmbH*, Rheinstetten, Deutschland) mit einem Raumtemperaturprobenkopf (*TXI*) durchgeführt. Es wurden lediglich 1D- ^1H Pulssequenzen mit einem einzigen 90°-Impuls ohne Wasserunterdrückung verwendet (*Bruker* Nomenklatur: *zg*). Bei einer spektralen Weite von 12 ppm wurden 2k Da-

tenpunkte aufgenommen, was zu einer Akquisitionszeit von 170 ms führte. Alle Daten wurden in nur einem Scan aufgenommen. Die Spektren wurden mit *Bruker Topspin 3.2* unter Verwendung eines exponentiellen Filters und einer Linienverbreiterung von 0,3 Hz prozessiert und auf DSS als internem Standard referenziert. Durch eine *Linear Prediction* unter Verwendung der ersten 500 Datenpunkte des FID (*Free Induction Decay*) konnte die effektive Zeitauflösung auf 42 ms reduziert werden.

Die Messungen mit dem automatisierten Druckregelsystem wurden an einem 800-MHz-NMR-Spektrometer (*Avance Serie, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland*) mit einem Raumtemperaturprobenkopf (*QXI*) durchgeführt. Es wurden wiederum lediglich $1D-^1H$ Pulssequenzen verwendet, diesmal aber mit Gradienten und *WATERGATE*-Wasserunterdrückung (*Bruker Nomenklatur: zgpgw5*). Bei einer spektralen Weite von 13 ppm wurden 66k Datenpunkte aufgenommen, was zu einer Akquisitionszeit von 2,97 s führte. Die Daten wurden mit 8 Scans aufgenommen, mit *Bruker Topspin 3.2* unter Verwendung eines exponentiellen Filters sowie einer Linienverbreiterung von 0,3 Hz prozessiert und auf DSS als internem Standard referenziert.

Die vorbereitende Messung der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der 10 mM Histidin enthaltenden Probe wurde auf dieselbe Art und Weise am 800-MHz-NMR-Spektrometer durchgeführt, allerdings unter Verwendung der manuellen Druckbank. Die spektrale Analyse der prozessierten Daten erfolgte ebenfalls mit *Bruker Topspin 3.2*.

Das Fitten der Daten wurde mit QtiPlot 0.9.8 (*Open-Source-Programm*) durchgeführt, unter Verwendung eines skalierten Levenberg-Marquardt-Algorithmus mit instrumenteller Gewichtung auf die Fehlergrenzen der verwendeten Messpunkte, welche sich aus der Auflösung des jeweiligen Experimentes ergaben. Das Toleranzniveau betrug hierbei 0,0001. Alle angegebenen Fehlergrenzen der Parameter beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %.

3.1.7 Sensorbasierte Druckmessungen

Der zeitliche Verlauf der Druckänderungen innerhalb der Drucksprungeinrichtung sowie außerhalb, bei den vorbereitenden Messungen dazu, wurde mit einem spannungsgesteuerten, auf einem Dehnungsmessstreifen basierenden Drucksensor (TPHA-E-D-B25C-L/0-2500BAR, *PTG - Pressure Technology Gesellschaft für Hochdrucktechnik mbH, Frankfurt, Deutschland*) durchgeführt. Die Auswertung des zeitlichen Verlaufs des Signals erfolgte mit einem digitalen Oszilloskop (DS1-102E-100MHz, *Rigol Technologies, Inc., Peking, China*).

3.2 Ergebnisse

Die wesentlichen Schritte bei der Entwicklung der automatisierten Hochdruckanlagen sowie die Ergebnisse der damit durchgeführten Messungen sollen nun aufgeführt werden.

3.2.1 Optimierung des Aufbaus der Hochdruck-Probe

Der handelsübliche Autoklav der Keramik-Zelle aus Messing stellte wegen der geringen Härte des verwendeten Materials eine Schwachstelle im druckdichten Verschluss dar. Aufgrund von merklichen Deformationen im Bereich des Anschlusses der Hochdruckleitung war mit auftretendem Druckverlust zu rechnen. Um dem präventiv vorzubeugen, wurde ein neuer Autoklav aus Titan konstruiert, welcher von der mechanischen Werkstatt der Fakultät für Biologie und Vorklinischer Medizin der Universität Regensburg ausgeführt wurde. Dieser gewährleistet nun den druckdichten Zusammenschluss mit der aus dem Spektrometer herausführenden Hochdruckleitung. Auf die korrekte Ausformung des Bauteils, gerade im Bereich des Lagerungs- sowie des Dichtungsringes galt es besonderes Augenmerk zu legen (Abbildung 3.1).

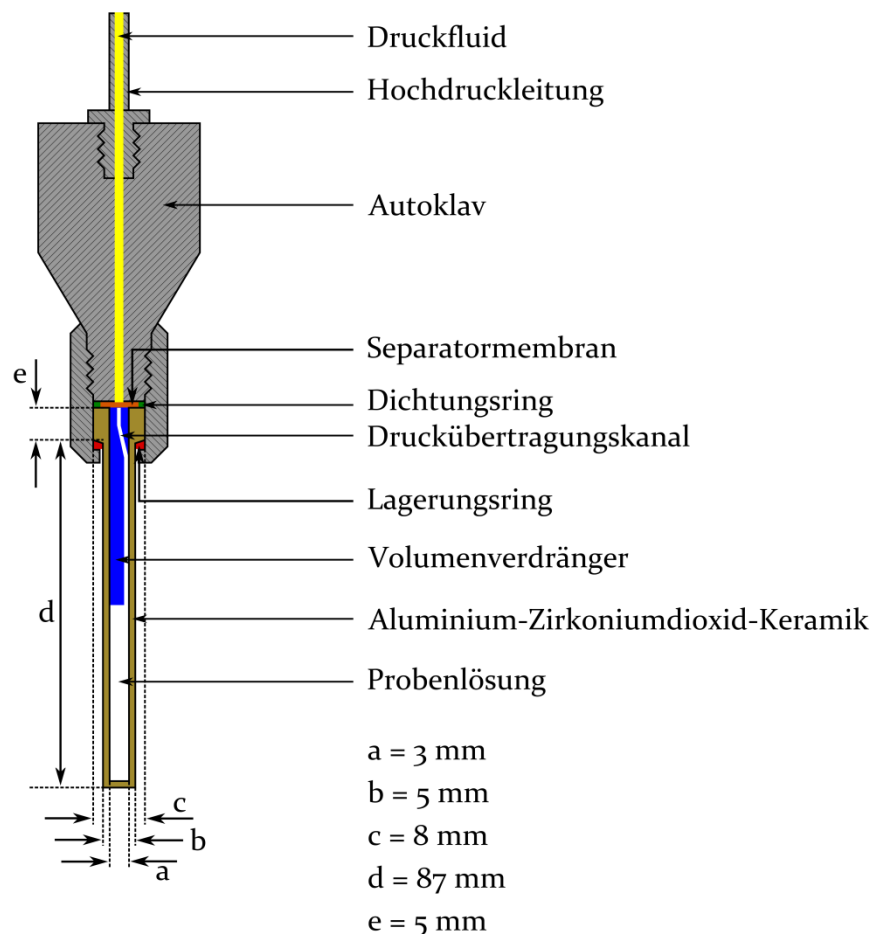


Abbildung 3.1: **Optimierter Aufbau der Hochdruckprobe.** Hochdruckautoklav (grau) mit Keramik-Zelle (braun), Dichtungsring (grün), Lagerungsring (rot) und dem Volumenverdränger (blau) mit dem integrierten Druckübertragungskanal. An dessen oberen Ende wird die Probenlösung (weiß) vom Druckfluid (gelb) mittels der Separatormembran (orange) getrennt.

Ein weiterer Nachteil der Keramik-Zelle selbst ist das mit Probe zu füllende Volumen außerhalb des sensitiven Bereich der Spulen des Probenkopfes. Um eine kosteneffiziente Nutzung der wässrigen Proben sicherzustellen, wurde ein zylindrischer Volumenverdränger entwickelt und ausgeführt. Das Polyetheretherketon (PEEK)-Stäbchen mit einem Durchmesser von 3 mm besitzt am oberen Ende eine zentrale Bohrung, welche ab einer Tiefe von 7 mm zur seitlichen, äußeren Abflachung hin verläuft (Abbildung 3.1). Über diesen Druckübertragungskanal ist die Probe letztendlich mit dem Fluid der Hochdruckleitung gasblasenfrei verbunden. Um eine Kontamination der wässrigen Probe mit dem Druckfluid zu verhindern, wurde eine flexible Polyethylen (PE) Membran eingesetzt, welche als den Druckübertragender Separator fungiert (Abbildung 3.1).

3.2.2 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Histidin

Es wurden die Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen der beiden Kohlenstoff gebundenen Protonen H^{ϵ_1} und H^{δ_2} des Imidazolringes der Histidin-Seitenkette (Abbildung 3.2) bei pH 7,0 und einer Temperatur von 293 K gemessen, um später die Ergebnisse des automatischen Drucksystems zu verifizieren. Daher wurde die Messung mit einer manuell betriebenen, geeichten Druckbank am 800-MHz-NMR-Spektrometer durchgeführt.

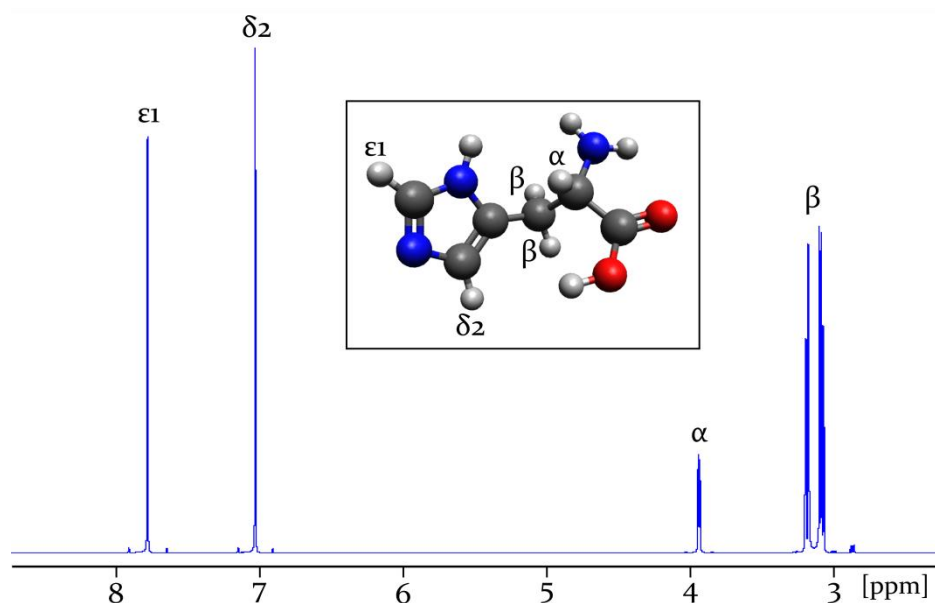


Abbildung 3.2: Zuordnung der Protonenresonanzen von Histidin. ^1H -NMR-Spektrum von 10 mM Histidin bei pH 7,0; $T = 293\text{ K}$ und $p = 0,1\text{ MPa}$. Die Resonanzen der beiden β -Protonen sind nicht stereospezifisch zugeordnet. Die chemische Verschiebung der beiden kohlenstoffgebundenen Protonen des Imidazolringes der Histidin Seitenkette H^{ϵ_1} und H^{δ_2} dienen als Drucksensor. Farbzuordnung im Molekülmodell: Kohlenstoff (dunkelgrau), Wasserstoff (hellgrau), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot).

Hierzu wurde der Druck von 0,1 MPa auf 200 MPa in Schritten von 50 MPa erhöht und jeweils eine NMR-spektroskopische Messung der chemischen Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ - und $H^{\delta 2}$ -Protonen des Imidazolringes der Histidin Seitenkette durchgeführt (Abbildung 3.3) sowie ihre Druckabhängigkeit mit Gleichung 2.12 gefittet. Es zeigte sich grundsätzlich bei $H^{\epsilon 1}$ eine mehr in Richtung Tieffeld verschobene Resonanz δ_0 bei 0,1 MPa als bei $H^{\delta 2}$. Desweiteren offenbarte sich bei $H^{\epsilon 1}$ eine fast um den Faktor vier höhere Druckabhängigkeit erster Ordnung, sowie eine um den Faktor drei stärkere Krümmung der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung (Tabelle 3.1). Beide Resonanzen verschoben sich mit steigendem Druck in Richtung Tieffeld und zeigten dabei einen asymptotischen Verlauf (Abbildung 3.3).

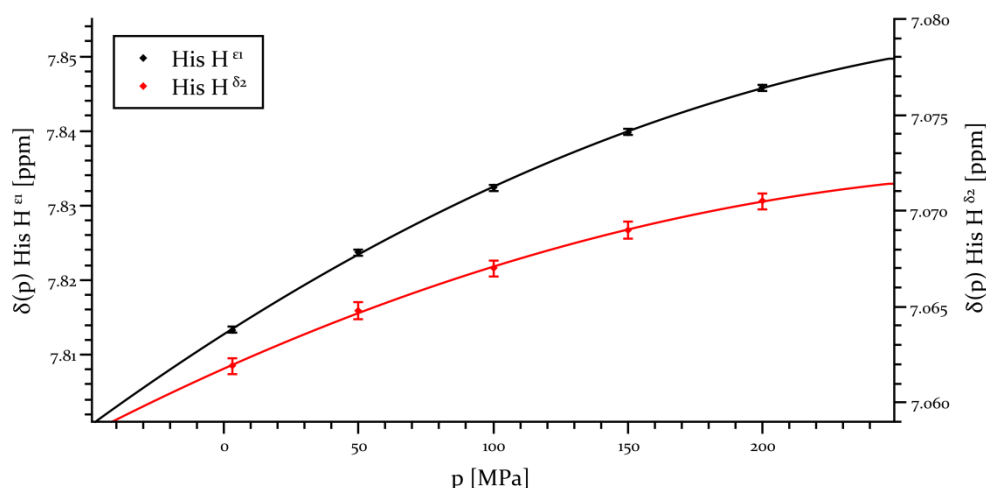


Abbildung 3.3: Druckantwort von Histidin mit manueller Druckbank. Druckabhängige chemische Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ - und $H^{\delta 2}$ -Protonen des Imidazolringes der Histidin Seitenkette in 10 mM His, 0,1 mM DSS, 90 % H_2O / 10 % D_2O bei pH 7,0, einer Resonanzfrequenz von 800 MHz und einer Temperatur von 293 K. Der Druck wurde mittels einer manuellen Druckbank generiert. Fehlergrenzen der Datenpunkte: digitale Auflösung des NMR-spektroskopischen Experimentes. Durchgezogene Linien: Fit der Messdaten mittels Gleichung 2.12 mit jeweils einem Determinationskoeffizienten von $R^2 > 0,99$.

	δ_0 [ppm]	B_1 [ppm GPa ⁻¹]	B_2 [ppm GPa ⁻²]
$H^{\epsilon 1}$	$7,8127 \pm 0,0004$	$0,23 \pm 0,01$	$-0,33 \pm 0,05$
$H^{\delta 2}$	$7,0618 \pm 0,0004$	$0,06 \pm 0,01$	$-0,10 \pm 0,05$

Tabelle 3.1: Druckkoeffizienten von Histidin mit manueller Druckbank. Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ - und $H^{\delta 2}$ -Protonen in 10 mM Histidin. δ_0 , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung in Gleichung 2.12. Messung mit manueller Druckbank bei 800 MHz Protonenresonanzfrequenz. Alle Fehlerangaben beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %.

3.2.3 Integriertes automatisiertes Druckregelsystem

Um den Nachteil der geringen Zeiteffizienz der manuellen Druckbank zu eliminieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein vollautomatisiertes, in die Steuerung des 800-MHz-NMR-Spektrometers integriertes Druckregelsystem entwickelt. Ziel war es, die Steuerung der Druckerzeugungseinheit auf das NMR-Spektrometer zu übertragen und somit die Anwesenheit des Experimentators während der Serie an laufenden Experimenten nicht länger erforderlich zu machen.

3.2.3.1 Automatisierung der Druckdefinition

Aufgrund verschiedener Restriktionen seitens der Herstellerfirma des NMR-Spektrometers (*Bruker Biospin GmbH*) war eine standardmäßige, digitale Kommunikation zwischen den Steuerrechnern des Spektrometers und der Druckerzeugungseinheit auf direktem Wege, beispielsweise via *Universal Serial Bus (USB)* oder *Local Area Network (LAN)*, nicht realisierbar.

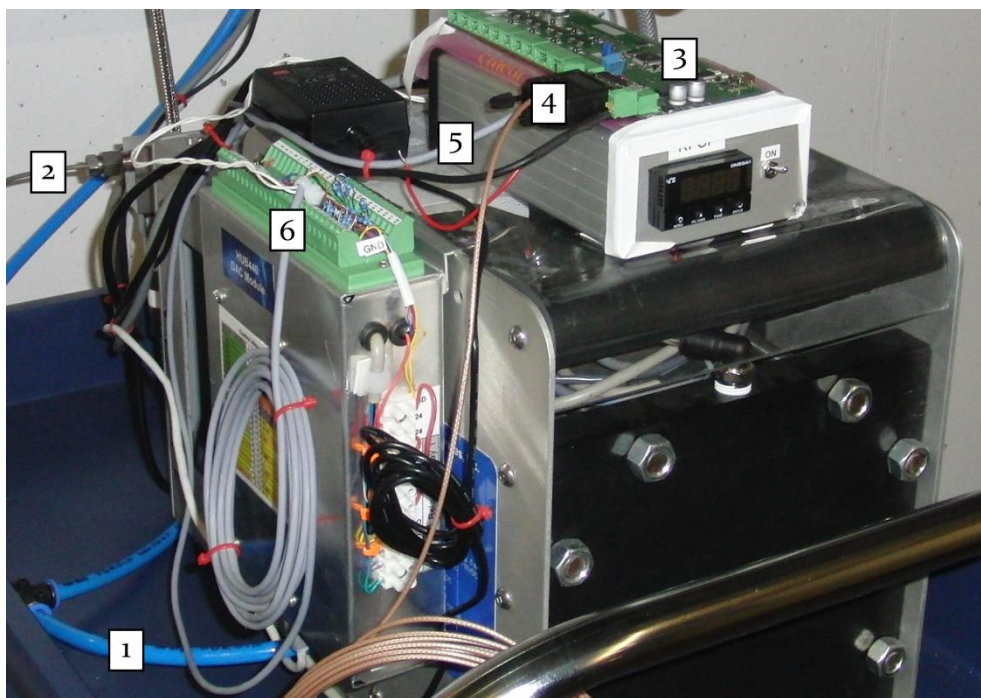


Abbildung 3.4: **Druckerzeugungseinheit Barocycler HUB₄₄₀**. Gasniederdruck-Zuleitung (1), Flüssigkeitshochdruck-Ableitung (2), Mikroprozessor (3) zur Konvertierung des zeitlichen Eingangssignals (4) in eine analoge Gleichspannung (5), analoger Eingang (6).

In Kooperation mit der Firma *Pressure Biosciences Inc.* wurde deshalb am *Barocycler HUB₄₄₀* (Abbildung 3.4) ein analoger Spannungseingang geschaffen, über diesen sich mittels eines elektromagnetischen Regelventils der pneumatische Eingangsniederdruck im Bereich von 0,1 MPa bis 0,5 MPa definieren lässt.

Da es zudem nicht möglich ist, über die Steuerkonsole des Spektrometers eine nun für die Ansteuerung der Druckerzeugungseinheit benötigte analoge, variable Gleichspannung auszugeben, wird ein digitales Zeitsignal mittels einer separaten Elektronik (*AME - Alexander Meier Elektronik GmbH*, Hohenfels, Deutschland) in eine Gleichspannung konvertiert.

Das *Akquisition System* (AQS) des *Avance*-Spektrometers stellt über die *Time Control Unit* (TCU) eine Reihe digitaler Ein- beziehungsweise Ausgänge zur Verfügung. Die Ausgänge können über ein Pulsprogramm des Spektrometers an- (high-Pegel) und ab- (low-Pegel) geschaltet werden. Der Status der Eingänge kann ebenfalls innerhalb eines Pulsprogrammes abgefragt werden. Dies ist die einzige Möglichkeit, eine Kommunikation des Spektrometers mit externen Geräten zu realisieren.

Das bereits angesprochene Zeitsignal definiert sich nun durch die Dauer eines Pulses an *Pin 3_16*, welcher durch Schalten von standardmäßigen 5 V auf 0 V und wieder zurück auf die Voreinstellung von 5 V erzeugt wird. Dieses Signal ist über den *Bayonet-Neill-Concelman* (BNC) Steckverbinder Nummer 1 der *Avance* Konsole des Spektrometers abzugreifen. In der Länge des low-Pegel-Zustandes der Spannung an *Pin 3_16* ist somit der gewünschte Druckwert kodiert. Das Schalten des Pins geschieht über ein gesondertes Pulsprogramm (*pressure-setting.jk*), welches unter anderem folgende, relevante Syntax enthält:

```
[...]
15    iu setnmr3|16
16    d10
17    iu setnmr3^16
[...]
```

In Zeile 15 wird *Pin 3_16* in seinen low-Pegel-Zustand versetzt, wonach in Zeile 16 eine variable Wartezeit (*delay d10*) verstreicht. Anschließend wird in Zeile 17 der standardmäßige high-Pegel-Zustand wiederhergestellt.

Über einen digitalen Eingang des Mikroprozessors (*ADuC841*, *Analog Devices*, Norwood, MA, USA) der Elektronik, welche die Konvertierung des Signals durchführt, wird die negative Flanke des Spannungspulses detektiert (Abbildung 3.4). Diese erzeugt dort einen Interrupt. Ein Zähler ermittelt die verstrichene Zeit bis zur Registrierung der positiven Spannungsflanke. Diese Pulslänge wird in eine Analogspannung umgerechnet und mittels eines integrierten Digital-/Analogwandlers ausgegeben. Ein nachgeschalteter Operationsverstärker passt die Spannung an den Eingangsbereich der Druckerzeugungseinheit von 0 V - 10 V an. Über den *AUX2* (auxiliary) genannten Verbinder wird diese direkt an das elektropneumatische Niederdruckregelventil weitergegeben und dort linear zur Spannung ein Druck von 0,1 MPa bis 0,5 MPa eingestellt. Dieser generiert über das feste Druckübersetzungsverhältnis des *Barocyler HUB440* einen hydraulischen Ausgangshochdruck von 0,1 MPa bis 200 MPa.

Somit gelang es, aus einer variablen Wartezeit *d10* von 0,1 ms bis 200 ms, welche in einem Pulsprogramm des NMR-Spektrometers verarbeitet werden kann, am Ende der Signaltrecke linear dazu einen Druck von 0,1 MPa bis 200 MPa zu erzeugen (Abbildung 3.5).

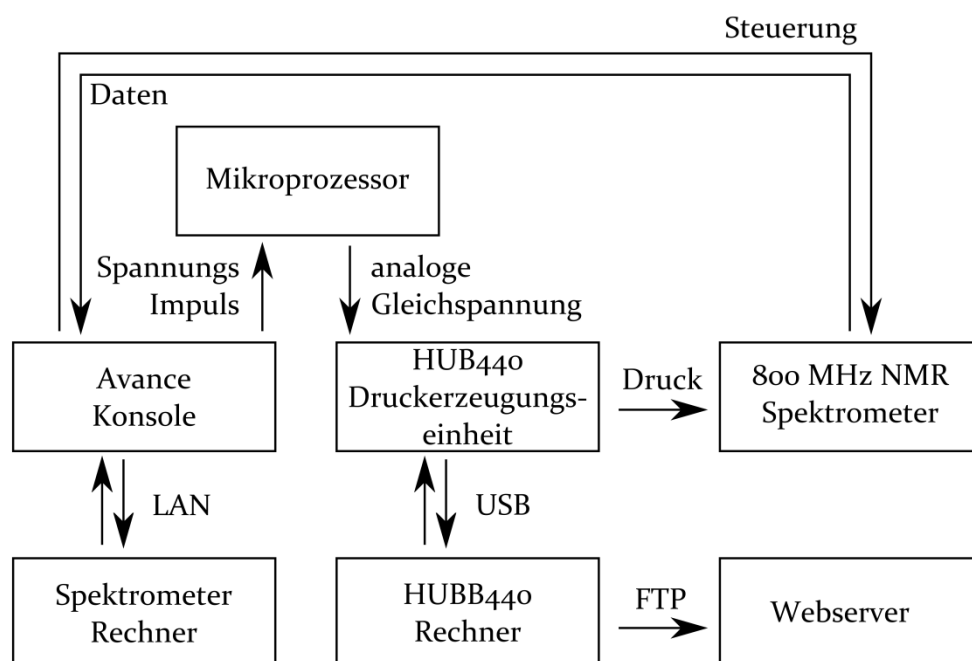


Abbildung 3.5: **Integriertes automatisiertes Druckregelsystem.** Schematische Darstellung des automatisierten, in die Steuerung des Bruker Avance 800-MHz-NMR-Spektrometers integrierten Druckregelsystems.

Auf einem separaten Steuerrechner überwacht eine von *Pressure Biosciences* entwickelte Software den hydraulischen Ausgangshochdruck des *Barocycler HUB440* und justiert mittels eines integrierten Regelkreises den pneumatischen Eingangsniederdruck fein. Somit wird für die Dauer des NMR-Spektroskopie-Experimentes größtmögliche Konstanz der Bedingungen gewährleistet. Die Verbindung zwischen Druckerzeugungseinheit und Steuerrechner wird standardmäßig bidirektional via *USB* hergestellt (Abbildung 3.5). Allerdings musste das Steuerprogramm seitens *Pressure Biosciences Inc.* dahingehend modifiziert werden, dass die Änderung sowie die Regelung des hydraulischen Ausgangshochdruckes auch ohne direkte Eingaben des Benutzers möglich waren. Ursprünglich bewirkte eine erneute Eingabe des Druckes aufgrund des dadurch verursachten großen Druckgradienten eine prinzipbedingte Abschaltung des Druckregelalgorithmus. Dieser musste standardmäßig nach erfolgter Druckänderung vom Benutzer erneut aktiviert werden. Im abgeänderten Steuerprogramm implementierte *Pressure Biosciences Inc.* deshalb eine automatische Reaktivierung des Regelalgorithmus bei Wiedererreichen eines konstanten Druckwertes. Dieser Vorgang benötigt allerdings inklusive der dann erfolgenden Stabilisierung des Druckes einige wenige Minuten.

Desweiteren werden separat, von einem Open-Source-Programm, vom Ausgabefenster der Steuersoftware der Druckerzeugungseinheit in kurzen Abständen Bildschirmabbilder erzeugt, welche durch das *File-Transport-Protocoll (FTP)* an einen Webserver übermittelt werden (Abbildung 3.5). Diese sind ortsunabhängig, über eine eigens zu diesem Zwecke eingerichtete Webpräsenz, vom Experimentator einsehbar. Somit erhält der Benutzer stets einen passiven Zugang zum Druckverlauf des Experimentes und kann gegebenenfalls einen auftretenden Fehler rechtzeitig erkennen.

3.2.3.2 Integration der Druckregelung

Das Steuerprogramm *Bruker Topspin* des NMR-Spektrometers sieht eine benutzerseitige Erweiterung der Funktionalität mittels C-basierter Programmierung in Form von sogenannten *AU-Programmen* (*auxiliary*) vor. Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Programm *fips-ppr.jk* (*Fully Integrated Pressure System - Positive Pressure Ramp*) (Anhang 9.1.1) ermöglicht es dem Benutzer, bis zu zehn verschiedene Kernspinresonanzspektroskopie-Experi-

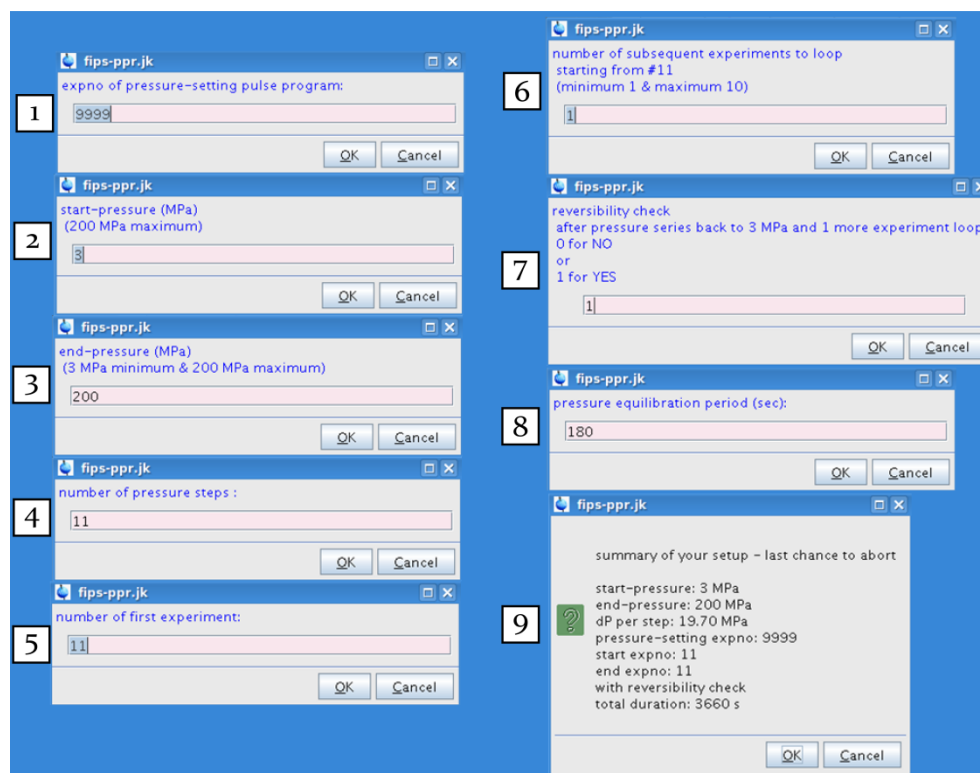


Abbildung 3.6: **fips-ppr.jk Eingabeaufforderungen.** In Reihenfolge ihrer Nummerierung auftretende Eingabefenster des AU-Programmes *fips-ppr.jk* zur Definition des gewünschten Druckverlaufs während des Experimentes.

mente zu definieren, welche bei jedem Druckniveau auszuführen sind. Dieser Satz von Experimenten muss vom Benutzer einmalig, vor Beginn der Serie erstellt und in der Verzeichnisstruktur des Programmes *Topspin* in gewünschter Reihenfolge mit ununterbrochener Nummerierung (*Experiment Number*; *expno*) abgelegt werden. Aus diesen Parametersätzen werden später automatisch Kopien generiert, welche bei jedem gewünschten Druckniveau ausgeführt werden. Desweiteren muss sich ein Parametersatz mit dem in Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen Pulsprogramm *pressure-setting.jk* im selben Ordner befinden.

Nach Starten des AU-Programmes *fips-ppr.jk* wird der Benutzer seitens verschiedener Eingabefenster durch die Definition der Drucksteuerung geführt (Abbildung 3.6). Die erste Eingabe verlangt die Nummer (*expno*) des Datensatzes mit dem Pulsprogramm *pressure-setting.jk*, welches letztendlich die Kommunikation mit der Druckerzeugungseinheit übernimmt. Der Standardwert hierfür lautet 9999 (Abbildung 3.6-1). Im Anschluss kann der Startdruck festgelegt werden. Sein Standardwert ist 3 MPa, sein maximal einzugebender Wert beträgt 200 MPa (Abbildung 3.6-2). Die Eingabe des Enddruckes gibt ein Intervall vom Startdruck beginnend bis 200 MPa als mögliche Eingabe vor (Abbildung 3.6-3). Desweiteren

muss der Enddruck größer als der Startdruck sein (*Positive Pressure Ramp*). Nach Definition des zu vermessenden Druckintervalls ist nun die Anzahl der gewünschten Druckniveaus dazwischen festzulegen (Abbildung 3.6-4). Hier muss der Experimentator darauf achten, wie hoch einerseits die gewünschte Auflösung der Druckachse sein soll, um die gewonnenen Daten adäquat fitten zu können. Andererseits bestimmt die Anzahl der Messpunkte auf der Druckachse ganz wesentlich die Gesamtdauer der Serie. Nachdem nun die Druckachse komplett definiert wurde, gilt es das erste Experiment auszuwählen, welches dann bei jedem Druckniveau zuerst ausgeführt wird (Abbildung 3.6-5). Standardwert hierbei ist der zum Zeitpunkt des Startens des Programmes *fips-ppr.jk* aktive Datensatz. Im Anschluss daran kann die Anzahl der bei jedem Druckwert auszuführenden Experimente, beim ersten beginnend, gewählt werden. Hierbei beträgt der minimal einzugebende Wert trivialerweise 1, der maximale 10 (Abbildung 3.6-6). Als vorletzte Eingabe steht ein optionaler Reversibilitätstest zur Verfügung, welcher nach erfolgreicher Ausführung des letzten Experimentes bei Maximaldruck eine weitere Messreihe bei Anfangsdruck ausführt (Abbildung 3.6-7). Somit lassen sich eventuelle, irreversible Effekte aufdecken. Zuletzt ist eine variable Wartezeit zwischen der Druckänderung und dem Shimmen des Magneten einzugeben (Abbildung 3.6-8). Mit ihr wird ein Gleichgewichtszustand gewährleistet, welcher nach etwa drei bis fünf Minuten erreicht ist. Diese Zeit ergibt sich aus der in Abschnitt 3.2.3.1 erwähnten Dauer der Reaktivierung des Regelalgorithmus des Steuerprogrammes der Druckerzeugungseinheit. Abschließend erhält der Benutzer eine Zusammenfassung seiner Eingaben und mit ihr die letzte Möglichkeit eines Abbruchs der Serie (Abbildung 3.6-9).

Das AU-Programm *fips-ppr.jk* erstellt im Anschluss die Kopien der Datensätze der Experimente und errechnet aus den eingegebenen Druckwerten die für das Pulsprogramm *pressure-setting.jk* benötigten Zeitwerte. Es wird im Verlauf der Serie vor jeder gewünschten Druckänderung dieses Pulsprogramm aufgerufen (Anhang 9.1.1, Zeile 84) und der Zeitwert in Millisekunden als Zeitvariable *d10* in die Akquisitionsparameter-Tabelle eingetragen. Im Anschluss wird das Pulsprogramm *pressure-setting.jk* ausgeführt (Anhang 9.1.1, Zeile 87). Nach erfolgter Druckänderung wird vom AU-Programm die spektrometerinterne Routine *Topshim 1D* zur Homogenisierung des magnetischen Feldes aufgerufen (Anhang 9.1.1, Zeile 91). Erst nach ihrem Abschluss beginnt die nächste Serie von Experimenten.

3.2.3.3 Sicherungsmechanismen vor Überschreiten des Maximaldruckes

Da bei diesem vollautomatisierten Druckregelsystem für die komplette Dauer der Messungen die Anwesenheit des Experimentators selbst nicht mehr von Nöten ist, bedarf es einiger Sicherungsmechanismen. Diese sollen ein Überschreiten des maximalen Druckes der Keramik-Zelle verhindern helfen. Denn im Falle eines Berstens des Probenröhrchens wäre mit nicht unerheblichen Schäden am Probenkopf des Spektrometers zu rechnen. Es wurden daher vier Barrieren in das System integriert, wobei zwei davon softwarebasiert und zwei hardwarebasiert sind.

Das AU-Programm *fips-ppr.jk* verweigert zum einen Druckeingaben von mehr als 200 MPa (Anhang 9.1.1, Zeilen 22, 30, 38), weshalb die maximal berechnete Zeitvariable *d10* nur 200 ms betragen kann. Zum anderen begrenzt das Steuerprogramm der Druckerzeugungseinheit den maximal regelbaren Druck ebenfalls auf 200 MPa. Da allerdings aufgrund einer Fehlfunktion in der Avance Konsole der low-Pegel-Zustand an *Pin 3_16* beliebig lang werden könnte und bei gleichzeitigem Abstürzen des Steuerprogrammes der Druckregleinheit der Druck dann zu hoch werden würde, bedarf es weiterer Barrieren. Zwar misst der Mikroprozessor den beliebig langen low-Pegel-Zustand, der nachgeschaltete Operationsverstärker ist aber nicht in der Lage Spannungen, welche größer als 10 V sind, auszugeben. Desweiteren

können am AUX2-Eingang der Druckregleinheit Spannungen über 10 V nicht verarbeitet werden.

Auf diese Art und Weise ist der maximal am magnetopneumatischen Eingangsniederdruckregelventil der Druckerzeugungseinheit ausgegebene Druck, entsprechend der 10 V, auf 0,5 MPa begrenzt. Dadurch ergibt sich ebenso, aufgrund des festen Übersetzungsverhältnisses, eine Limitierung des hydraulischen Ausgangshochdruckes.

Es bleibt zu bemerken, dass es absolute Sicherheit, trotz Treffen aller erdenklichen Vorkehrungen, niemals geben kann!

3.2.3.4 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Histidin

Um die korrekte Funktionalität des automatisierten, integrierten Druckregelsystems zu überprüfen, wurden nach der Kalibrierung des Druckregelkreises mittels des geeichten Bourdon-Manometers der manuellen Druckbank erste Messungen an Histidin durchgeführt. Um die Ergebnisse sinnvoll validieren zu können, wurde die selbe Probe unter den selben Bedingungen wie in Abschnitt 3.2.2 verwendet. Wiederum wurden also die druckabhängigen chemischen Verschiebungen der beiden an Kohlenstoff gebundenen Protonen $H^{\epsilon 1}$ und $H^{\delta 2}$ des Imidazolringes der Histidin Seitenkette (Abbildung 3.2) bei pH 7,0 und einer Temperatur von 293 K gemessen. Der Druckbereich erstreckte sich ebenso von 0,1 MPa bis 200 MPa, diesmal allerdings mit einer höheren Auflösung der Druckachse von insgesamt elf Messpunkten (Abbildung 3.7).

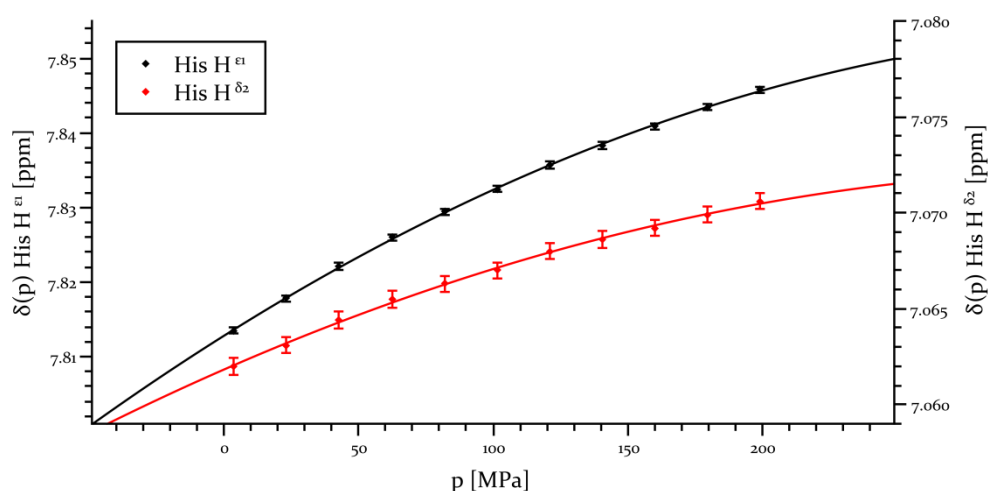


Abbildung 3.7: Druckantwort von Histidin mit integriertem automatisiertem Druckregelsystem. Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der beiden kohlenstoffgebundenen Ring-Protonen von 10 mM Histidin; 0,1 mM DSS, 10 % D_2O , 90 % H_2O bei pH 7,0 und $T = 293\text{ K}$; gemessen mit dem automatisierten Druckregelsystem bei 800 MHz Protonenresonanzfrequenz. Eingezeichnete Fehler entsprechen der digitalen Auflösung des $1D\text{-}^1H\text{-NMR}$ Experiments. Durchgezogene Linien: Polynomialer Fit zweiter Ordnung mittels Gleichung 2.12 jeweils mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 > 0,99$.

	δ_0 [ppm]	B_1 [ppm GPa ⁻¹]	B_2 [ppm GPa ⁻²]
$H^{\epsilon 1}$	7,8128 \pm 0,0004	0,227 \pm 0,008	-0,31 \pm 0,04
$H^{\delta 2}$	7,0618 \pm 0,0004	0,062 \pm 0,008	-0,09 \pm 0,04

Tabelle 3.2: Druckkoeffizienten von Histidin mit integriertem automatisiertem Druckregelsystem. Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ - und $H^{\delta 2}$ -Protonen in 10 mM Histidin. δ_0 , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung aus Gleichung 2.12. Messung mit automatisierter Druckregelanlage bei 800 MHz Protonenresonanzfrequenz. Alle Fehlerangaben beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %.

Die Daten wurden mit Gleichung 2.12 polynomial gefittet. Die Ergebnisse stimmten mit den Resultaten in Abschnitt 3.2.2 innerhalb der jeweiligen Fehlergrenzen überein (Tabellen 3.1 und 3.2). Zudem konnte eine signifikante Präzisierung um eine Größenordnung beim Koeffizienten der linearen Druckabhängigkeit B_1 erreicht werden. Dies war auf die höhere Anzahl an Messpunkten entlang der Druckachse zurückzuführen.

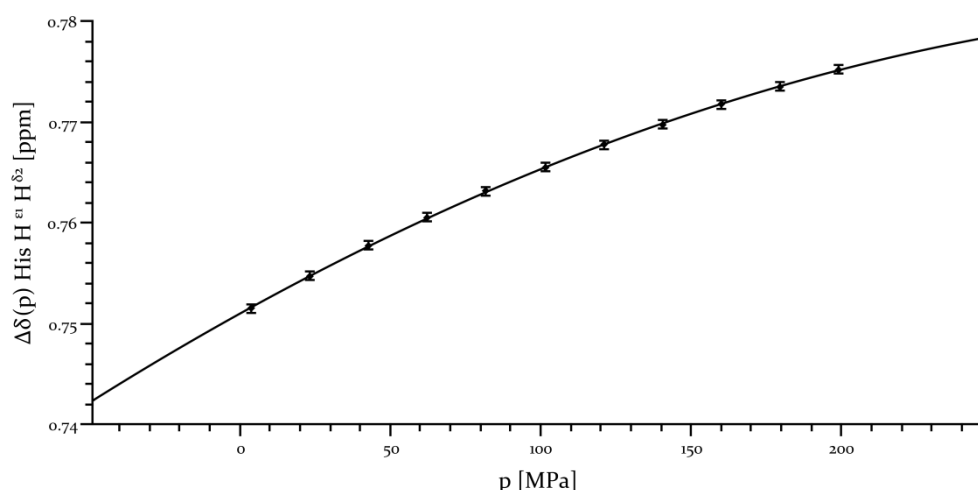


Abbildung 3.8: Druckabhängige Differenz der Resonanzen in Histidin. Druckabhängigkeit der Differenz $\Delta\delta(p)$ der chemischen Verschiebungen der beiden kohlenstoffgebundenen Ring-Protonen von Histidin $H^{\epsilon 1}$ und $H^{\delta 2}$; 10 mM His, 10 % D_2O , 90 % H_2O bei pH 7,0 und $T = 293$ K; gemessen mit dem automatisierten Druckregelsystem bei 800 MHz Protonenresonanzfrequenz. Eingezeichnete Fehler entsprechen der digitalen Auflösung des 1D- 1H -NMR Experiments. Durchgezogene Linien: Polynomialer Fit zweiter Ordnung mittels Gleichung 2.12 jeweils mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 > 0,99$.

Auch die druckabhängige Differenz der beiden chemischen Verschiebungen wies keinen linearen Zusammenhang auf (Abbildung 3.8), was bereits aus den Koeffizienten zweiter Ordnung in Tabelle 3.2 ersichtlich ist. Nur bei verschwindender Nichtlinearität nach der Subtraktion wäre dies gegeben. Somit erfüllt auch die Differenz nicht die ideale Bedingung einer Eichkurve über weite Bereiche der Druckachse. Allerdings bleibt zu bemerken, dass $\Delta\delta(p)$ eine vom Standard DSS unabhängige Beschreibung des Druckverlaufs erlaubt.

3.2.4 Automatisierte Drucksprungeinrichtung

Um die Limitierung bezüglich der Zahl der Druckniveaus der bereits vorhandenen Drucksprungeinrichtung [Arno2a, Kren1] zu reduzieren sowie die Steuerung benutzerfreundlicher zu gestalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine völlig neue Apparatur konzeptioniert und realisiert. Zudem sollten bereits bei der Planung Ansatzpunkte für zukünftige Weiterentwicklungen geschaffen werden.

3.2.4.1 Voruntersuchungen an den Komponenten

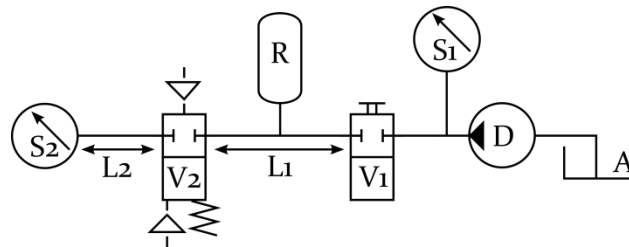


Abbildung 3.9: Aufbau der Voruntersuchungen der Komponenten. Schematische Darstellung der Messaufbauten der Voruntersuchungen an den Komponenten der Drucksprungeinrichtung. Atmosphärendruck-Vorratsbehälter (A), Druckerzeugungseinheit (D), Drucksensoren (S), manuell betriebenes Absperrventil (V_1), untersuchtes Ventil (V_2), Druckreservoir (R) inklusive Zuleitung (L_1), variable Messstrecke (L_2).

Die bestimmende Größe einer Drucksprungeinrichtung ist die Flankendauer einer damit erzeugten Druckänderung. Diese wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Die Kenntnis der dominantesten Einflussfaktoren war unabdingbar für die Realisierung einer solchen Apparatur. Eine vollständige, theoretische Beschreibung der thermodynamischen Prozesse innerhalb der Drucksprungeinrichtung wäre nicht ohne komplexe Simulationen mittels beispielsweise finiter Elemente machbar gewesen. Diese Möglichkeit war aus Zeitgründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Option. Es blieb die Möglichkeit, die Komponenten experimentell zu analysieren. In Abbildung 3.9 ist der schematische Aufbau dieser Voruntersuchungen dargestellt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde die Zuleitung (L_1 , Abbildung 3.9) stets so mit Druck beaufschlagt, dass nach Öffnen des Ventils V_2 , unabhängig von der jeweiligen Geometrie des Aufbaus, am Drucksensor S_2 ein Drucksprung von 0,1 MPa auf 100 MPa erfolgte. Um ein Nachpumpen der Druckerzeugungseinheit zu verhindern, war ein Trennen dieser von der restlichen Apparatur mittels eines manuell betriebenen Absperrventils V_1 von Nöten.

Die grundlegende Konfiguration beinhaltete ein mit Druck beaufschlagtes Reservoir-Volumen von 2,0 ml, welches zu Beginn lediglich aus der Zuleitung L_1 bestand, sowie ein beim Sprung zu beaufschlagendes Volumen zwischen Ventil V_2 und Sensor S_2 (L_2) von 0,2 ml.

Als Ventile standen zwei Typen von Nadelventilen zur Verfügung, deren Unterschied im Nadeltrieb bestand: ein federloser *air-to-open/air-to-close* Mechanismus der Firma HIP sowie eine Ausführung mit einer Feder zur Schließung, also eine *air-to-open/spring-to-close*

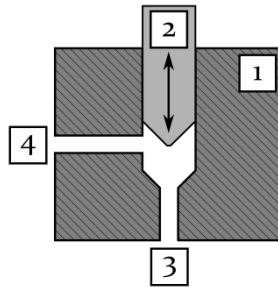


Abbildung 3.10: **Aufbau Nadelventil.** Ventilkörper (1) mit Ventilnadel (2) und axialem (3) sowie lateralem (4) Hochdruckanschluss. Die Durchflussrichtungen des Druckfluids durch den Ventilkörper beim Öffnen der Nadel werden definiert als: Richtung 1 (von 4 nach 3) und Richtung 2 (von 3 nach 4).

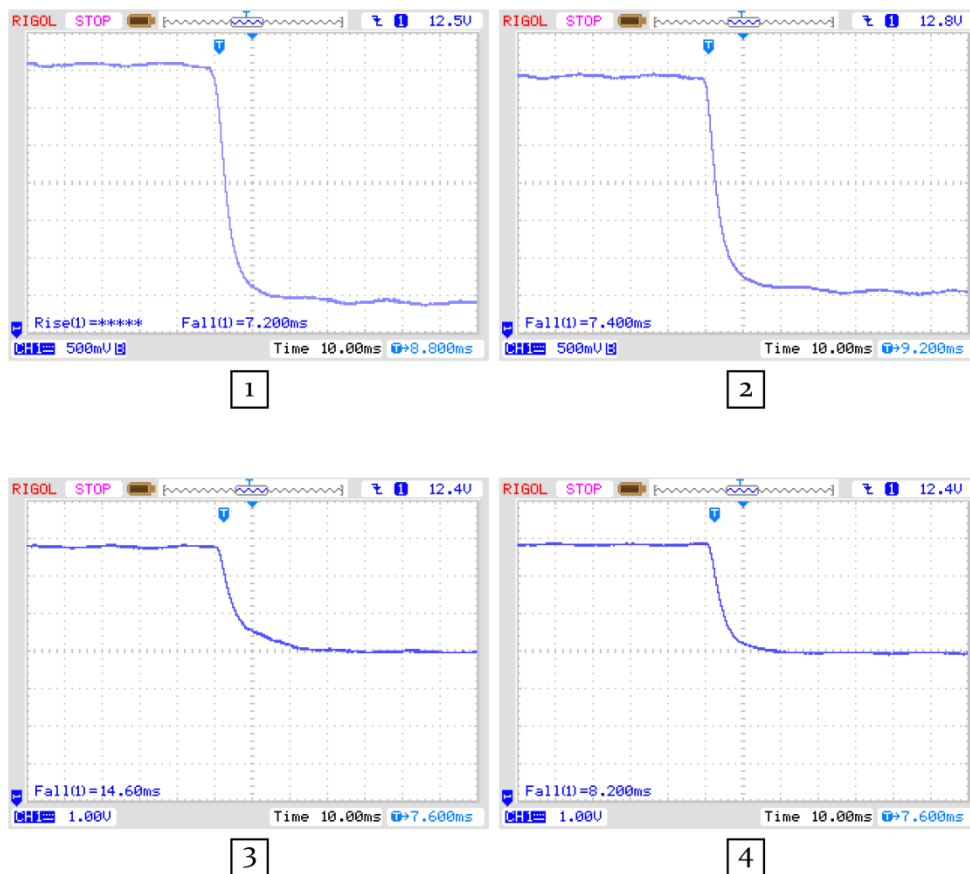


Abbildung 3.11: **Richtungsabhängige Druckmessung an zwei Ventilen.** Zeitabhängige Spannung am Drucksensor gemessen für zwei verschiedene Ventile und je zwei verschiedene Durchflussrichtungen. (1) HIP - Richtung 1; (2) HIP - Richtung 2; (3) PBI - Richtung 1; (4) PBI - Richtung 2; Der Spannungsabfall betrug jedesmal etwa 12,5 V, wobei der hohe Spannungswert mit dem niedrigen Druckwert zu assoziieren ist; auf der Abszisse entspricht ein Kästchen 10 ms. Die niedrigere Stufe bei (3) und (4) ist lediglich auf eine größere Skalierung der Anzeige zurückzuführen.

Variante, der Firma *PBI*. Generell besitzen die hier verwendeten Ventilkörper im Inneren einen rechtwinklig verlaufenden Druckkanal. Die von oben einfahrende Nadel befindet sich damit zu einem Anschluss in axialer Orientierung, der andere Anschluss kann als lateral bezeichnet werden (Abbildung 3.10). Um die Schaltzeiten der Ventile in Abhängigkeit der Strömungsrichtung durch den Ventilkörper zu ermitteln, wurden die Ventile wechselweise mit dem lateralen und dem axialen Anschluss an die Zuleitung (L_1 , Abbildung 3.9) angeschlossen. Da beim Ausgleich eines Druckgradienten durch das Öffnen des Ventils (V_2 , Abbildung 3.9) immer eine Strömung des Fluids hin zur Niederdruckseite erfolgt, lassen sich zwei Richtungen definieren: die Durchflussrichtung vom lateralen zum axialen Anschluss (Abbildung 3.10) wird als Richtung 1 bezeichnet, die entgegengesetzte als Richtung 2.

Jede Messung wurde zehnmal ausgeführt, die Ergebnisse anschließend gemittelt. Die Fehlerangaben entsprechen der Standardabweichung innerhalb einer Serie von Messungen. Das *HIP*-Ventil offenbarte gleichmäßig schnelle Schaltzeiten für beide Richtungen von $7,6 \pm 0,4$ ms (Richtung 1) beziehungsweise $7,5 \pm 0,2$ ms (Richtung 2). Das *PBI*-Ventil dagegen zeigte eine starke Richtungsabhängigkeit mit $14,8 \pm 0,7$ ms in Richtung 1 und $8,6 \pm 0,4$ ms in Richtung 2 (Abbildung 3.11).

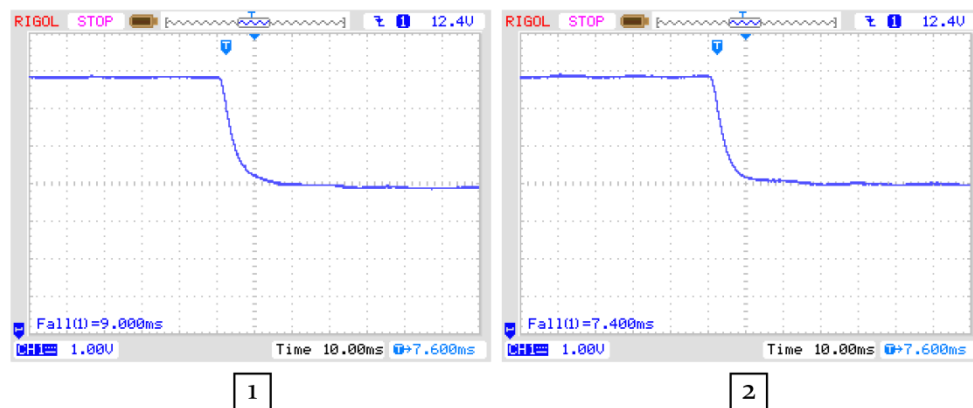
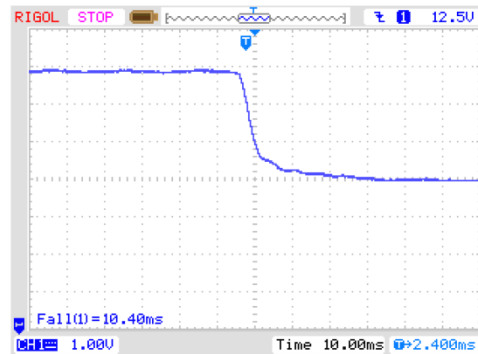


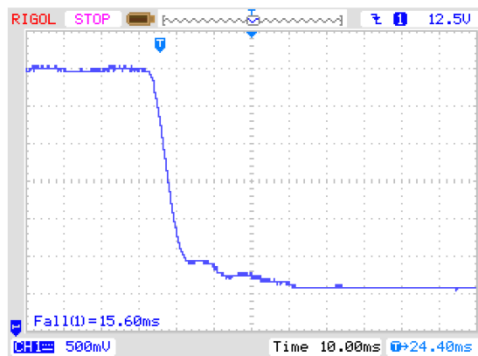
Abbildung 3.12: Richtungsabhängige Druckmessung mit vergrößertem Druckreservoir. Zeitabhängige Spannung am Drucksensor gemessen für zwei verschiedene Durchflussrichtungen durch das *PBI*-Ventil mit einem zusätzlichen Volumen (R , Abbildung 3.9) von 5,4 ml vor dem Ventil. (1) Richtung 1; (2) Richtung 2; Der Spannungsabfall betrug jedesmal 12,4 V, wobei der hohe Spannungswert mit dem niedrigen Druckwert zu assoziieren ist.

Die Bauart des Triebes am *HIP*-Ventil garantiert einerseits zwar gleichmäßig schnelle Schaltzeiten in beide Richtungen im einstelligen Millisekundenbereich, wie gezeigt werden konnte. Andererseits erzeugt das *HIP*-Ventil bauartbedingt aber sehr starke mechanische Schwingungen während des Schaltvorganges. Aufgrund der relativ großen bewegten Masse des Diaphragma-Stößel-Triebes und den dadurch, beim wechselseitigen Beaufschlagen mit jeweils 0,5 MPa Gasdruck, verbundenen Kräften, eignet es sich nicht als Sprungventil nahe am Spektrometer. Es zeigte sich später, dass sensitive NMR-spektroskopische Messungen unmittelbar nach dem Schaltvorgang wegen zu starker Vibrationen nicht möglich waren. Daher können sich die im Folgenden gezeigten Ergebnisse der Voruntersuchungen auf das *PBI*-Ventil beschränken.

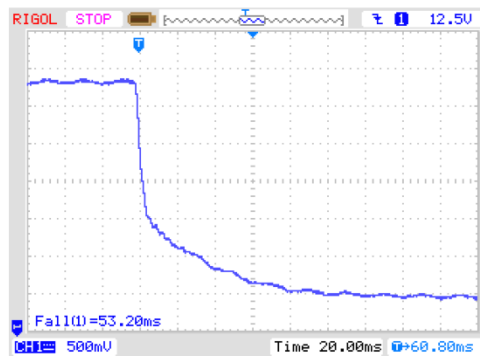
Durch Vergrößern des Druckreservoirs vor dem Ventil mittels eines zusätzlichen Volumens (R , Abbildung 3.9) auf gesamt 7,4 ml, ließen sich die Flankendauern am Sensor reduzieren und die Richtungsabhängigkeit des Ventils teils kompensieren. Nun besaß das Ventil in Richtung 1 eine Sprungzeit von $9,4 \pm 0,6$ ms, in Richtung 2 benötigte der Druckanstieg $7,1 \pm 0,3$ ms (Abbildung 3.12). Die Flankendauer beim Durchströmen des Ventilkörpers vom lateralen zum axialen Anschluss ließ sich also durch das größere, mit Druck beaufschlagte Volumen um 36 % reduzieren. In der schnelleren, entgegengesetzten Richtung registrierte man immerhin noch eine Reduktion um 17 %. An der generellen Flankenform war dagegen kein signifikanter Unterschied auszumachen (Abbildungen 3.11 und 3.12).



1



2



3

Abbildung 3.13: **Leistungsabhängige Druckmessung.** Zeitabhängige Spannung am Drucksensor gemessen für drei verschiedene Leitungen zwischen dem PBI-Ventil und dem Sensor; jeweils Durchflussrichtung 1 und ein Reservoir-Volumen von 7,4 ml vor dem Ventil. (1) 130 cm 1/8" (0,5 ml); (2) 260 cm 1/8" (0,8 ml); (3) 130 cm 1/4" (4,8 ml); Leitungslängen mit dem jeweils gesamt zu beaufschlagenden Volumen inklusive Anschluss in Klammern. Der Spannungsabfall betrug jedesmal 12,5 V, wobei der hohe Spannungswert mit dem niedrigen Druckwert zu assoziieren ist. Die niedrigere Stufe bei (1) ist lediglich auf eine größere Skalierung der Anzeige zurückzuführen.

Zuletzt galt es noch die Einflüsse unterschiedlicher Leitungen zwischen Ventil und Sensor zu untersuchen. Hierzu wurde stets ein Reservoir-Volumen von 7,4 ml als Druckspeicher sowie die schnellere Richtung 2 des PBI-Ventils benutzt.

Durch Verwendung einer 1/8"-Leitung mit einer Länge von 130 cm vergrößerte sich das Volumen von L_2 (Abbildung 3.9) auf 0,5 ml. Die Flankendauer wies bei dieser Geometrie einen um 48 % erhöhten Wert von $10,5 \pm 0,6$ ms auf. Verdoppelte man diese Strecke auf 260 cm (0,8 ml), so ergab sich ein Wert von 15 ± 2 ms, was einer Verbreiterung der ursprünglichen Flanke um 110 % entsprach. Bei Verwendung der dickeren 1/4"-Leitung lag die Flankendauer nach einer Strecke von 130 cm, was einem Volumen L_2 von 4,8 ml entsprach, bereits bei 50 ± 3 ms. Aufgrund dieser enormen Vergrößerung der Sprungzeit erübrigte sich eine weitere Verlängerung der Teststrecke. In Abbildung 3.13 sind Beispiele der gemessenen Flanken zu sehen. Hierbei zeigten sich im Vergleich zu Abbildung 3.12 signifikante Änderungen der Flankenform bei langen Laufstrecken. Speziell bei Verwendung der dicken 1/4"-Leitung entstand nach anfänglich schneller Druckänderung eine zunehmende Abflachung zu ihrem Ende hin.

Um einen direkten Einfluss der Laufzeit der Druckstörung selbst auf die Flankenform abzuschätzen, wurde zusätzlich ein zweiter Sensor gleicher Bauart nach dem Ersten eingesetzt und über den 2. Kanal des Oszilloskops ausgewertet. Beide Sensoren trennte die bereits Verwendung gefundene 1/8"-Leitung mit einer Länge von 260 cm, wobei sich der eine Sensor direkt nach dem Ventil, der andere am Ende der Strecke befand. Da sich keine signifikante zeitliche Verzögerung des Flankenansangs auf der Teststrecke nachweisen ließ, ist der Wert der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Druckstörung in der Größenordnung der Trägheit der Dehnungsmessstreifen der Sensoren im Bereich von unter 5 ms zu verorten. Lediglich das Flankenende war am zweiten Sensor um den bereits bekannten Wert verschoben (Abbildung 3.13-2). Somit ist von einer Bewegungsgeschwindigkeit der Druckstörung innerhalb der Flüssigkeitssäule in der Größenordnung der Schallgeschwindigkeit von $1485,4 \text{ m s}^{-1}$ auszugehen. Da diese bei höheren Drücken noch zunimmt (50 MPa: $1568,8 \text{ m s}^{-1}$) [Bel99], ist der Effekt der Ausbreitungsgeschwindigkeit hierbei zu vernachlässigen.

Die aus den Voruntersuchungen zu extrahierenden Einflussfaktoren auf die Flankendauer sowie deren Form lassen sich somit folgendermaßen zusammenfassen:

- Die Durchflussrichtung durch den Ventilkörper: strömt das Medium vom axialen zum lateralen Anschluss des Ventils, so begünstigt der Fluss die Öffnung der Nadel.
- Das Hochdruckvolumen vor dem Ventil: ein großes Kompressionsvolumen stellt beim Öffnen des Ventils einen großen Energiespeicher dar, welcher aufgrund der Expansion des Fluids zu einem schnelleren Druckausgleich führt.
- Die verwendeten Leitungsquerschnitte und Längen: bei großen Innendurchmessern oder langen Leitungen wird viel Volumen verschoben, was aufgrund der Strömungsreibung und der Trägheit des Mediums zu einer breiteren Geschwindigkeitsverteilung und damit einhergehend zum Abflachen der Flanke führt.

3.2.4.2 Aufbau der Drucksprungeinrichtung

Um Sprünge zwischen zwei beliebigen Druckniveaus zu realisieren, benötigt die Drucksprungeinrichtung zwei Druckspeicher, welche vor jeder Messung mit den jeweiligen Ladedrücken zu beaufschlagen sind. Ein Nachpumpen während des Experimentes wäre aufgrund der Trägheit der Druckerzeugungseinheit nicht zielführend. Die beiden Druckspeicher R_1 und R_2 (Abbildung 3.14) bestehen aus Hochdruckleitungen mit einem Außendurchmesser von $9/16''$ und einem Innendurchmesser von $3/16''$. Bei einer Länge der Reservoirleitungen von jeweils 150 cm ergibt sich ein Volumen von 27 ml pro Speicher.

Der Drucksprung wird letztendlich durch Öffnen des *PBI*-Ventils erzeugt (V_7 , Abbildung 3.14). Hierbei ist der axiale Anschluss des Bauteils mit der Probe zu verbinden, da die großen Volumina der Druckspeicher die breitere Flanke der langsameren Richtung des Ventils kompensieren (siehe hierzu Abschnitt 3.2.4.1). An den Ventilpositionen V_1 bis V_6 (Abbildung 3.14) kommen die federlosen *HIP*-Ventile zum Einsatz. Als Hochdruckleitungen dienen bis V_7 Edelstahlrohre mit $1/4''$ Außendurchmesser und spektrometerseitig ab V_7 diejenigen mit $1/8''$ Außendurchmesser, um das zu beaufschlagende Probenvolumen so gering wie möglich zu halten.

3.2.4.3 Steuerung der Drucksprungeinrichtung

Die Schnittstelle zwischen dem Rechner des Spektrometers und der Drucksprungeinrichtung stellt eine eigens konzipierte Steuerelektronik (*AME - Alexander Meier Elektronik*)

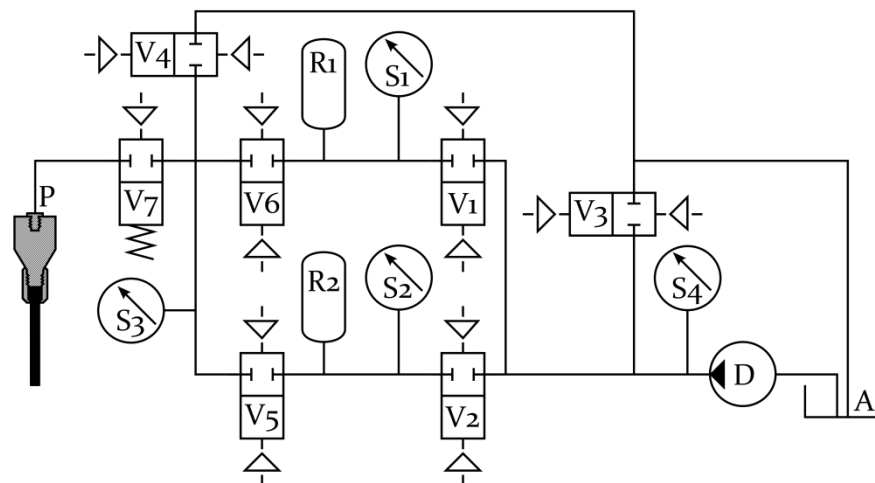


Abbildung 3.14: **Schematischer Aufbau der Drucksprungeinrichtung.** Die Druckerzeugungseinheit (D) wird aus dem Atmosphärendruckreservoir (A) mit Druckfluid versorgt. Es sind sechs Ventile der Bauart *air-to-open/air-to-close* (V_1 - V_6) verbaut, wobei V_3 und V_4 Auslassventile zur Atmosphärendruck-Rückföhrleitung darstellen. V_1 und V_2 verschließen die Hochdruckreservoirs R_1 und R_2 auf Seite der Druckerzeugungseinheit, V_6 und V_5 auf Seite des Spektrometers. Das Ventil V_7 der Bauart *air-to-open/spring-to-close* föhrt den eigentlichen Drucksprung an der Probe (P) herbei (der detaillierte Aufbau der Hochdruckprobe ist in Abbildung 3.1 zu sehen). Vier Drucksensoren S_1 - S_4 messen den Druck in den jeweiligen Abschnitten der Drucksprungeinrichtung.

GmbH, Hohenfels, Deutschland) dar, deren Mikroprozessor (ADuC841, Analog Devices, Norwood, MA, USA) sowohl über je zwei Feldeffekttransistoren die magnetopneumatischen Ventiltriebe steuert, als auch über einen Digital-/Analogwandler die Einstellungen des pneumatischen Niederdrucks der Druckerzeugungseinheit regelt. Desweiteren werden vom Mikroprozessor über einen Strom-/Spannungswandler die Sensorsignale eingelesen. Über eine USB-Schnittstelle ist die Steuerelektronik mit einem Rechner verbunden. Von dort aus lassen sich über eine Windows-Applikation die Druckniveaus sowie deren zeitliche Dauer benutzerfreundlich definieren.

Grundsätzlich kommunizieren die Steuerrechner des Spektrometers und der Drucksprungeinrichtung über das Schalten von Pins der Avance Konsole miteinander. Dies geschieht analog zur im Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen Methode, wobei im Falle der Drucksprungeinrichtung am Bruker Avance 500-MHz-NMR-Spektrometer sowohl digitale Eingänge als auch Ausgänge benutzt werden. Da hier keine Information zu übertragen ist, sondern die Pins lediglich als Trigger-Signale fungieren, ist die jeweilige Dauer der *high*- und *low*-Pegel-Zustände irrelevant. Es sind nur die Flanken der Spannungsänderungen für eine funktionierende zeitliche Koordination von Bedeutung.

Das Pulsprogramm des Spektrometers beinhaltet am Anfang eine spezielle Sequenz zur zeitlichen Koordinierung mit der Drucksprungeinrichtung. Das Schalten des digitalen Ausganges an *Pin 4_13* (Zeile 12, Anhang 9.1.2) stellt den Start-Trigger dar, worauf die Drucksprungeinrichtung die Sequenz zum Laden der Druckspeicher ausführt (Abbildung 3.15). Nach einer festen Zeit von 200 μs wird er wieder auf den *low*-Pegel-Zustand zurück geschaltet, was nicht detektiert wird (Zeile 14, Anhang 9.1.2). Dies geschieht lediglich deshalb, weil

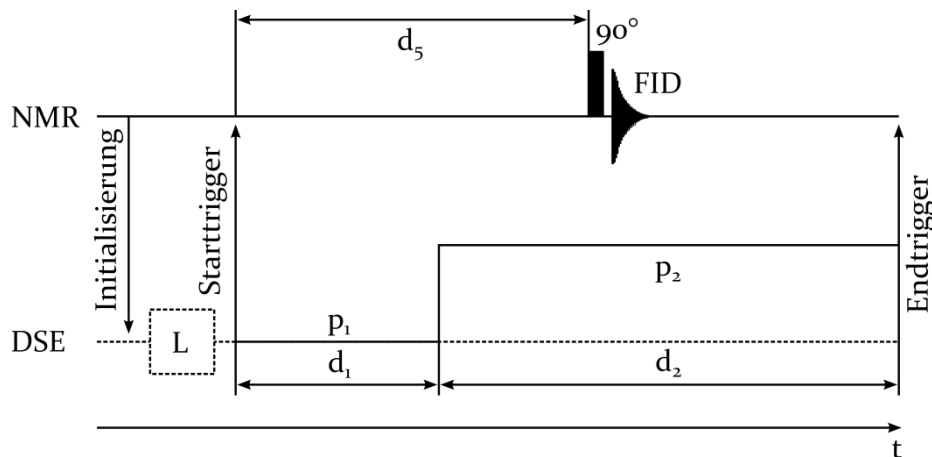


Abbildung 3.15: **Schematischer Ablauf des Drucksprungexperimentes.** Zeitliche Koordinierung der Pulssequenz des Spektrometers (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) mit dem Druckverlauf (DSE, Drucksprungeinrichtung) exemplarisch am Beispiel eines zg-Pulsprogrammes (siehe hierzu auch Anhang 9.1.2). Nach der Initialisierung vom Spektrometer zur Drucksprungeinrichtung (*Pin 4_13* schaltet auf *high*-Pegel, das Zurückschalten ist nicht relevant und somit nicht eingezeichnet) findet das Laden (L) der Druckspeicher statt. Danach setzt die Drucksprungeinrichtung den Eingangs-Pin 3 am Spektrometer in den *high*-Pegel-Zustand; das stellt den Starttrigger dar. Nach der Zeit d_1 springt der Druck von p_1 auf p_2 , welcher für die Zeit d_2 gehalten wird. Mittels der Variablen d_5 lässt sich der 90° -Impuls des Spektrometers beliebig in der Drucksequenz platzieren. Nach Ablauf der Drucksequenz wird der Eingangs-Pin 3 wieder in den *low*-Pegel-Zustand versetzt; dies stellt den Endtrigger dar.

zu Beginn des nächsten Zyklus wieder auf den high-Pegel geschaltet werden können muss. Das Pulsprogramm des Spektrometers wird nun solange angehalten, bis am Eingangs-Pin 3 ein *high*-Pegel-Zustand registriert wird (Zeile 15, Anhang 9.1.2). Diese positive Gleichspannung am Eingang der Konsole des Spektrometers wird nach erfolgtem Laden der Reservoirs vom Mikroprozessor der Drucksprungeinrichtung erzeugt und über die gesamte Dauer der Drucksequenz beibehalten. Dieser Trigger stellt das Startsignal der eigentlichen Puls- sowie Drucksequenz dar. Die Zeitvariablen d_1 und d_2 sind die Halteperioden der Druckniveaus p_1 und p_2 der Drucksprungeinrichtung. Bei deren geeigneter Abstimmung mit der Zeitvariablen d_5 des Spektrometers (Abbildung 3.15), lässt sich die Druckflanke beliebig in jeder Pulssequenzen platzieren. Nach Ablauf der Variable d_2 , also nach dem Ende des zweiten Druckniveaus, schaltet der Mikroprozessor der Drucksprungeinrichtung den digitalen Eingang der Konsole wieder auf den *low*-Pegel-Zustand zurück, was den eigentlichen Trigger für das Starten der nächsten Schleife darstellt. Dies ist deshalb von Bedeutung, da das Spektrometer zu Beginn der Pulssequenz (Zeile 9, Anhang 9.1.2) solange wartet, bis ein solcher *low*-Pegel-Zustand registriert wird. Somit wird gewährleistet, dass kein neues Laden der Reservoirs initiiert wird, solange die zweite Druckperiode noch nicht abgelaufen ist. Dadurch müssen die Wiederholzeiten der Druck- und der Pulssequenz nicht exakt gleich gewählt werden

3.2.4.4 Sensorbasierte Messungen der Druckflanken

Ähnlich zur in Abschnitt 3.2.4.1 beschriebenen Methode wurde in einem ersten Validierungsschritt die zeitliche Druckänderung mit einem Sensor und einem digitalen Oszilloskop gemessen. Nun aber an der realen Drucksprungeinrichtung, inklusive der auch später im NMR-Experiment verwendeten Probenleitung von V7 zum Autoklaven der Hochdruckprobe. Zur Simulation des Probenvolumens diente ein Adapter, an den der Sensor montiert war. Bei einem Drucksprung von 0,1 MPa auf 64 MPa, also einer positiven Druckänderung, ergab sich eine Flankendauer von 12 ± 1 ms. Bei negativer Druckänderung zwischen den selben Niveaus betrug die Dauer der Flanke $12,8 \pm 0,2$ ms (Abbildung 3.16).

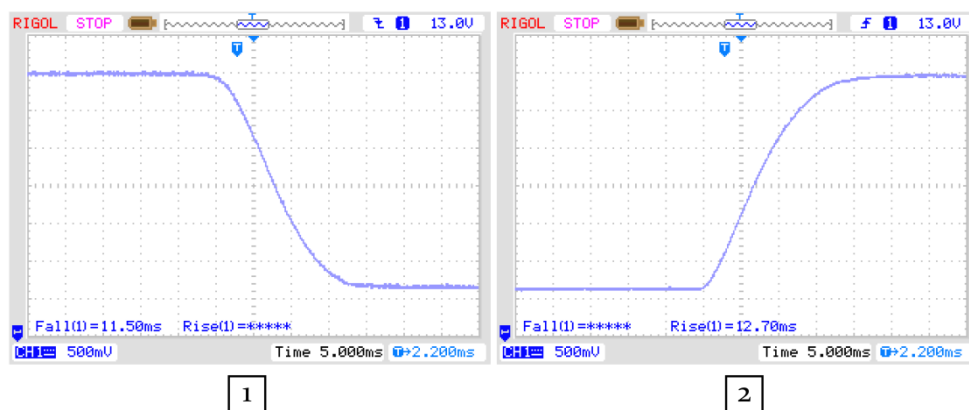


Abbildung 3.16: **Druckverlauf im Drucksprungexperiment.** Zeitabhängige Spannung am Drucksensor gemessen für beide Richtungen der Druckänderung in der realen Drucksprungeinrichtung an der Probenposition. Die Druckänderung erfolgte von 0,1 MPa auf 64 MPa (1) und von 64 MPa auf 0,1 MPa (2); es ist die höhere Spannung am Sensor mit dem niedrigeren Druck zu assoziieren. Abszisse: 5 ms pro Kästchen.

3.2.4.5 NMR-spektroskopische Messungen

Der Regelbetrieb der Drucksprungeinrichtung sieht Pulse unmittelbar vor oder nach der Druckflanke vor, oder beides. Die eigentliche Datenakquisition findet in allen Fällen am Ende der Drucksprungssequenz statt. Um allerdings die Funktionalität der Anlage zu überprüfen und die Messung der exakten Dauer der Druckänderung aus Abschnitt 3.2.4.4 zu reproduzieren, ist ein kontinuierliches Abtasten der Flanke unabdingbar.

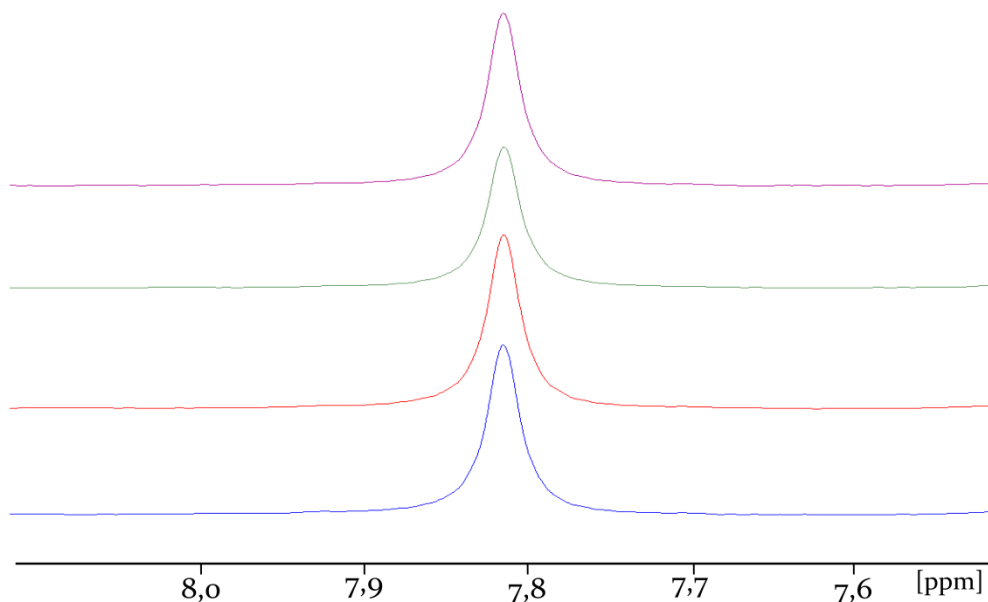


Abbildung 3.17: **Zeitliche Annäherung an die Druckflanke.** Ausschnitt aus den Protonenspektren im Bereich um die Resonanzlinie von His H^{et} bei 0,1 MPa. 1055 ms (blau), 255 ms (rot), 155 ms (grün) und 55 ms (violett) vor der Mitte der Druckflanke. Spektren prozessiert mit Linear Prediction und exponentiellem Filter; die Verwendung lediglich der ersten 500 Datenpunkte des FID führt zu einer effektiven Akquisitionsdauer von 42 ms.

Als Maß der zeitlichen Änderung des Druckes im Probengefäß wurde die chemische Verschiebung des H^{et} -Protons in 100 mM Histidin verwendet. Die sehr schnellen druckabhängigen Änderungen des pK-Wertes der Histidin Seitenkette führen zu instantanen Änderungen der chemischen Verschiebung relativ zur untersuchten Zeitskala. Um hierbei eine größtmögliche Zeitauflösung zu erlangen, wurde eine Probe mit 100 mM Histidin verwendet, was eine Akquisitionszeit von 170 ms ermöglichte. Trotzdem unterlagen die einzelnen Spektren großen Störungen, wenn die Aufnahme der Daten zeitlich mit der Druckänderung zusammenfiel. Dieser Effekt war auf Instabilitäten während der schnellen Druckänderung zurückzuführen, welcher allerdings keinen Einfluss auf die Lage der Maxima der Resonanzlinien hatte. Beschränkte man die Rohdaten auf die ersten 500 Punkte des FID, welche bereits die komplette Information über die chemische Verschiebung enthielten, so ließ sich die effektive Zeit der Datenaufnahme auf 42 ms verkürzen. Mittels *Linear Prediction* wurde der FID vor der Prozessierung komplettiert, was zum einen die bereits erwähnten Verzerrungen minderte (Abbildung 3.17) und zum anderen die zeitliche Auflösung des Experimentes erhöhte. Die während der Flanke selbst aufgenommenen Spektren unterlagen allerdings auch mit der verwendeten Methode starken Störungen. Trotzdem blieben auch hier die Positionen der Maxima der druckabhängigen Resonanzlinien auswertbar (Abbildung 3.18).

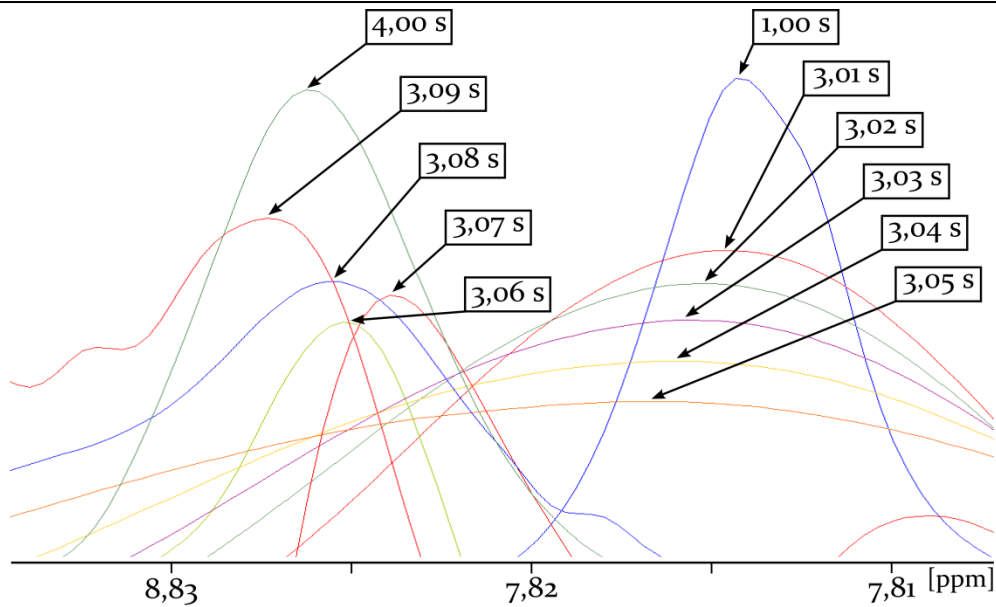


Abbildung 3.18: **Druckabhängige Resonanz von His $H^{\delta 1}$ im Drucksprungexperiment.** Mittels verschiedener Zeitvariablen d_5 (Abbildung 3.15) lässt sich der 90° -Impuls, welcher die messbare Quermagnetisierung erzeugt, entlang der Zeitachse verschieben und dadurch die Druckflanke abtasten. Aufgrund starker Störungen während des Drucküberganges sind die Spektren enorm verzerrt, was aber keinen Einfluss auf die Lage der Maxima (Pfeile) der Resonanzlinien hat. Einzelspektren prozessiert mit Linear Prediction unter Verwendung der ersten 500 Datenpunkte des FID.

Mittels Gleichung 2.19 lässt sich aus der gemessenen chemischen Verschiebung die Zeitabhängigkeit des Druckverlaufs in der Probe extrahieren. Zudem wird so die exakte Lage der Flankenmitte t_0 ebenfalls gefittet. Will man diese zeitliche Positionierung der Flanke beurteilen, so ist zu bedenken, dass die Zeitvariable d_i des ersten Druckniveaus p_i (Abbildung 3.15) bei den nachfolgenden Experimenten stets 3 s betrug. Somit ergab sich eine effektiv verzögerte Flankenmitte t_0^{eff} aus $t_0 - 3$ s.

Um die Ergebnisse mit den sensorbasierten Messungen vergleichen zu können, wurden in einem ersten Schritt ebenfalls Drucksprünge von Atmosphärendruck auf ein Hochdruckniveau von 64 MPa durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der chemischen Verschiebung ist in Abbildung 3.19 zu sehen. Betrachtet man die messtechnisch relevante Flankendauer (10 % bis 90 % der Niveaudifferenz), so ergab sich bei einer positiven Druckänderung eine Sprungzeit von 12 ± 4 ms und ein t_0^{eff} von 54 ± 1 ms. Unter inversen Bedingungen, bei einem Sprung vom Hochdruckniveau auf Atmosphärendruck, ergaben sich leicht erhöhte Sprungzeiten von 17 ± 2 ms und ein t_0^{eff} von 67 ± 1 ms (Abbildung 3.19).

In einem zweiten Validierungsschritt war die geforderte Fähigkeit des Sprunges zwischen zwei vom Atmosphärendruck abweichende Niveaus zu überprüfen. Das erste Druckniveau befand sich nun bei 87 MPa, das zweite bei 163 MPa. In diesem Versuch ergaben sich analog zum ersten Schritt bestimmte Sprungzeiten von $12,7 \pm 0,7$ ms und ein t_0^{eff} von $15,1 \pm 0,3$ ms für eine positive und $12,5 \pm 0,1$ ms sowie ein t_0^{eff} von $38,59 \pm 0,03$ ms für eine negative Druckänderung (Abbildung 3.20).

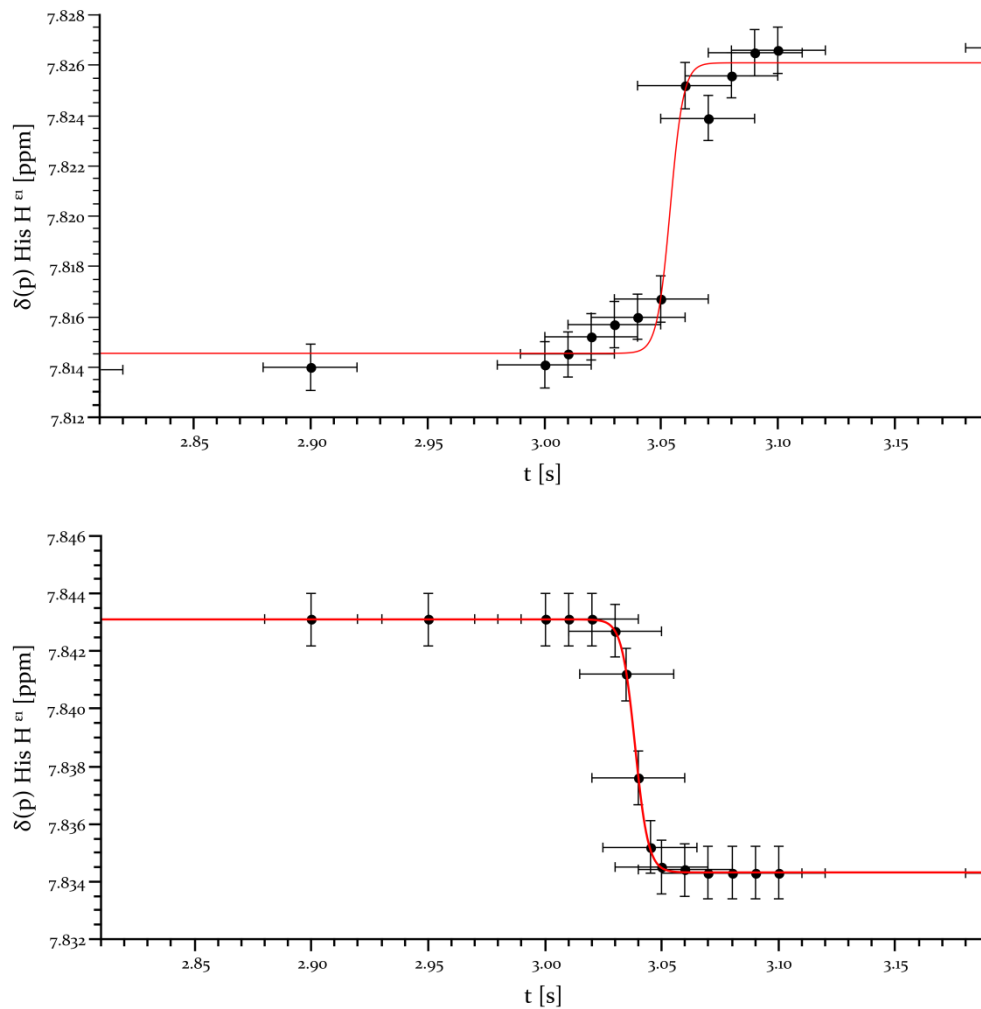


Abbildung 3.19: **Drucksprungexperiment mit Atmosphärendruck.** Zeitlicher Verlauf der druckabhängigen chemischen Verschiebung des $H^{\epsilon 1}$ -Protons in 100 mM Histidin im Drucksprungexperiment. Aus ihr kann mittels Gleichung 2.19 direkt auf den jeweils herrschenden Druck innerhalb der Probe geschlossen werden. **Oben:** Sprung von 0,1 MPa auf 64 MPa mit einer Sprungzeit von 12 ± 4 ms. **Unten:** Sprung von 64 MPa auf 0,1 MPa mit einer Sprungzeit von 17 ± 2 ms. Eingezeichnete Fehler des Hochwertes entsprechen der digitalen Auflösung des $1D$ - 1H -NMR Experimentes; Fehler des Rechtswertes ergeben sich aus der endlichen Akquisitionszeit der ersten 500 Datenpunkte des FID. Rote Linien: Sigmoidaler Fit der Daten mittels Gleichung 2.19 mit einem Determinationskoeffizienten R^2 von jeweils 0,98.

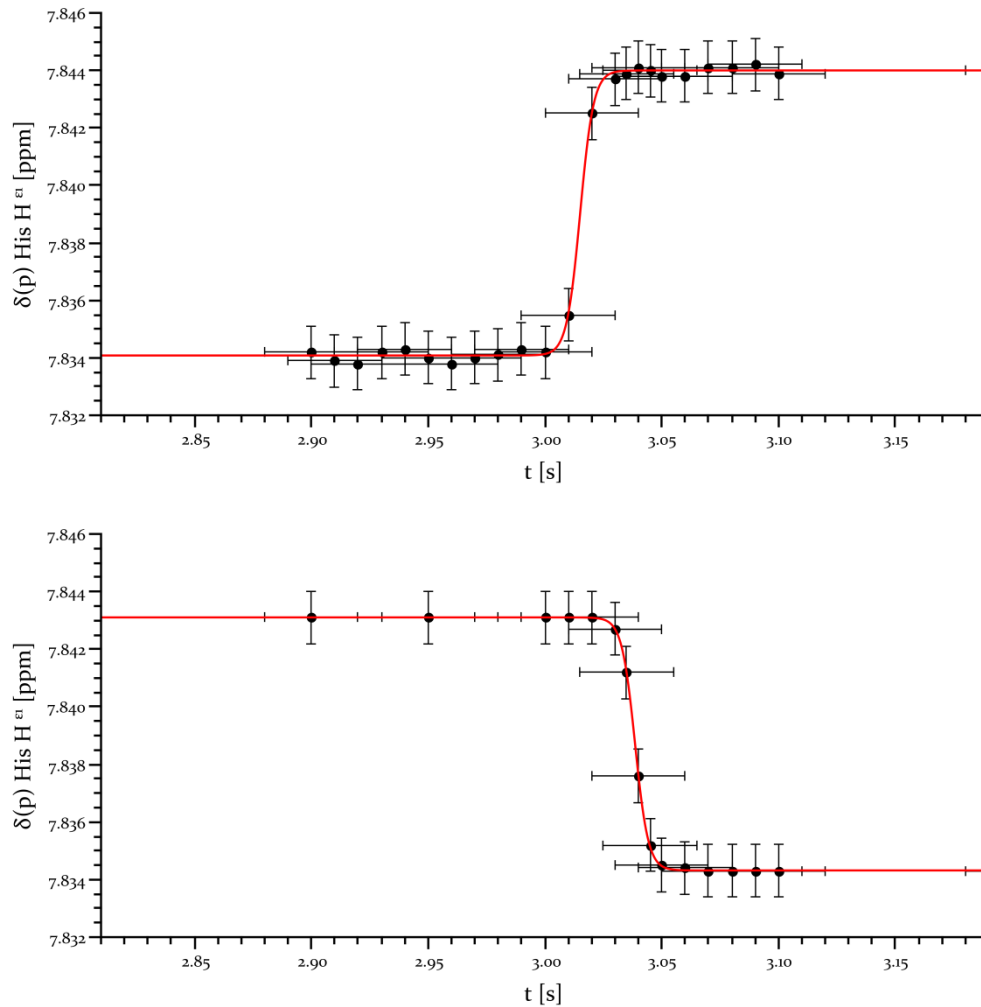


Abbildung 3.20: **Drucksprungexperiment ohne Atmosphärendruck.** Zeitlicher Verlauf der druckabhängigen chemischen Verschiebung des $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Protons in 100 mM Histidin im Drucksprungexperiment. Aus ihr kann mittels Gleichung 2.19 direkt auf den jeweils herrschenden Druck innerhalb der Probe geschlossen werden. **Oben:** Sprung von 87 MPa auf 163 MPa mit einer Sprungzeit von $12,7 \pm 0,7$ ms. **Unten:** Sprung von 163 MPa auf 87 MPa mit einer Sprungzeit von $12,5 \pm 0,1$ ms. Eingezeichnete Fehler des Hochwertes entsprechen der digitalen Auflösung des $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ Experimentes; Fehler des Rechtswertes ergeben sich aus der endlichen Akquisitionszeit der ersten 500 Datenpunkte des FID. Rote Linien: Sigmoidaler Fit der Daten mittels Gleichung 2.19 mit einem jeweiligen Determinationskoeffizienten $R^2 > 0,99$.

3.3 Diskussion der Ergebnisse

Im nun folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der methodischen Entwicklungen im Bereich der Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie zusammengefasst und bewertet werden.

3.3.1 Aufbau der Hochdruckprobe

Nach dem Optimieren des Aufbaus der Hochdruckprobe konnten, eine korrekte Montage vorausgesetzt, weder Druckverlust noch eine Kontamination der wässrigen Proben mit dem Druckfluid festgestellt werden. Es lassen sich nun auf verlässliche Art und Weise druckinduzierte Änderungen verschiedener Parameter mittels NMR-Spektroskopie bestimmen. Das in diesem Kapitel vorgestellte Beispiel der druckabhängigen chemischen Verschiebung wird im nächsten Kapitel noch intensiviert erörtert. Die hier gemessenen Änderungen der Resonanzfrequenzen der kohlenstoffgebundenen Protonen des Imidazolringes der Histidin Seitenkette lassen sich auf druckinduzierte Änderungen des pK-Wertes zurückführen. Somit stellt speziell Histidin auch eine sehr feine Sonde für Schwankungen des pH-Wertes der Lösung dar.

3.3.2 Integriertes automatisiertes Druckregelsystem

Das integrierte, automatisierte Druckregelsystem am 800-MHz-Spektrometer stellt eine enorme Effizienzsteigerung bei den Hochdruckmessungen dar. Eben darauf gründet sich auch die hohe Akzeptanz des Systems innerhalb der Arbeitsgruppe. Die überaus geringe Fehleranfälligkeit ist als weiterer Vorteil anzuführen. Zudem ist das System in der Lage, kleine Druckverluste zu kompensieren. Trotz dieser großen Erfolge sind dennoch einige Weiterentwicklungen denkbar. Zum einen gilt es, weitere *AU*-Programme zu schreiben, welche auf die spezifischen Bedürfnisse der unterschiedlichen Projekte der Mitarbeiter der Arbeitsgruppe abzielen. Dadurch wären beliebige Druckverläufe realisierbar. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Programm *fips-ppr.jk* (Anhang 9.1.1) ist nur in der Lage, eine positive Druckrampe mit diskreten Stufen zu erzeugen. Weitere Abwandlungen könnten daraus auf triviale Art und Weise erzeugt werden. Zum anderen wäre die Einrichtung einer bidirektionalen Verbindung zwischen dem Spektrometerrechner und dem Druckgenerator wünschenswert (Abbildung 3.5). Mit ihr könnte über einen digitalen Eingang der *Avance* Konsole ein Fehlerindikator an das steuernde *AU*-Programm übergeben werden. Ein Anhalten des gesamten Experimentes im Falle einer Fehlfunktion, wie beispielsweise eines nicht korrekt erreichten Druckwertes, wäre somit implementierbar. Dies würde speziell beim standardmäßigen Aufsummieren der Daten mehrerer Scans ein Überschreiben bereits gewonnener Information verhindern. Desweiteren wäre eine bidirektionale Verbindung auch der Sicherheit des Systems zuträglich.

3.3.3 Automatisierte Drucksprungeinrichtung

Mit der Entwicklung der Drucksprungeinrichtung konnten die gesetzten Ziele erreicht werden. Es wurde zudem relevantes Wissen über Einflussfaktoren auf die Flankenzeiten der Druckänderung gewonnen.

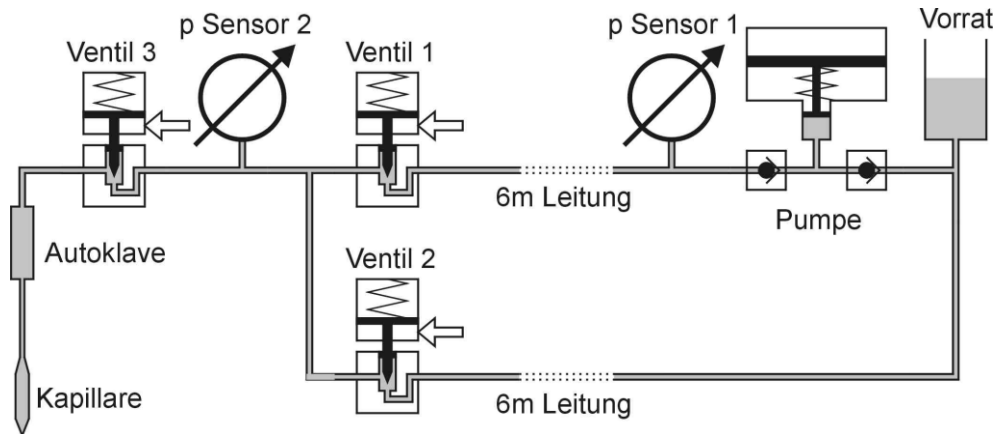


Abbildung 3.21: **Schematischer Aufbau der Drucksprungeinrichtung aus dem Jahre 2002.** Bei geöffnetem Ventil 1 und geschlossenen Ventilen 2 und 3 konnte mit Öffnen des Ventils 3 auf den Druck der Pumpe gesprungen werden. In dieser Situation konnte bei geschlossenem Ventil 1 mit Öffnen von Ventil 2 vom Pumpendruck auf atmosphärisches Niveau gesprungen werden. Es war aufgrund der Trägheit der verwendeten Ventile nicht möglich, beide Vorgänge hintereinander innerhalb eines Experimentes auszuführen. Quelle Abbildung: [Arno2a].

Die Drucksprungeinrichtung aus dem Jahre 2002 konnte zum einen lediglich Sprünge zwischen atmosphärischem Druck und einem definierten Niveau erzeugen. Zum anderen betrug die kürzeste gemessene Flankendauer 30 ms, welche allerdings mit einem Sensor (*p Sensor 2*, Abbildung 3.21) in der Nähe des Sprungventils gemessen wurde. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 3.22 zu sehen.

Da der korrekte Zusammenhang zwischen Leitungsinnendurchmesser und der Steilheit der Flanke damals noch nicht bekannt war, ging man bei der Realisierung der Anlage im Jahre 2002 noch von dem Fall aus, dass ein dicker Querschnitt aufgrund geringerer innerer Reibung zu schnelleren Sprungzeiten führen würde. Das dieser Annahme zugrunde liegende Gesetz von Hagen-Poiseuille [Arno2a] ist unter den auftretenden Bedingungen offensichtlich nicht zutreffend, oder zumindest nicht der bestimmende Faktor. Die gezeigte Ausbreitung der Druckstörung in der Größenordnung der Schallgeschwindigkeit ist mit Sicherheit nicht auf eine laminare Strömung des Fluids innerhalb des Systems zurückzuführen. Vielmehr muss hier eine Verdichtungswelle ursächlich sein. Die unabhängig von der Geometrie der Anlage instantane Registrierung des Anfangs der Druckflanke spricht sehr für diesen Zusammenhang. Das Ende der Druckflanke dagegen hängt stark vom Volumenverhältnis vor und nach dem Sprungventil ab. Muss ein relativ zur Expansion des Reservoirvolumens großes Volumen mit Druck beaufschlagt werden, so verschiebt sich das Ende der Flanke zeitlich nach hinten. Dies liegt nun tatsächlich an Strömungseigenschaften des Fluids innerhalb der Anlage, da der Volumendefekt, resultierend aus der Kompression des zu beauf-

schlagenden Volumens, aus den Druckspeichern nachfließen muss. Wohlgedenkt dürfte diese Strömung unter den gegebenen Bedingungen aber trotzdem nicht laminar sein. Folglich ist das zu verschiebende Volumen, ergo der Teil der Drucksprungeinrichtung, welcher spektrometerseitig auf das Sprungventil folgt, für schnelle Druckänderungen möglichst klein zu halten.

Da aber nun 2002, folgerichtig zu den damaligen Annahmen, in der alten Anlage von Ventil 3 (Abbildung 3.21) zur Hochdruckprobe eine möglichst dicke Leitung benutzt wurde, ist dort von einer Flankendauer an der Probenposition von bis zu 50 ms auszugehen.

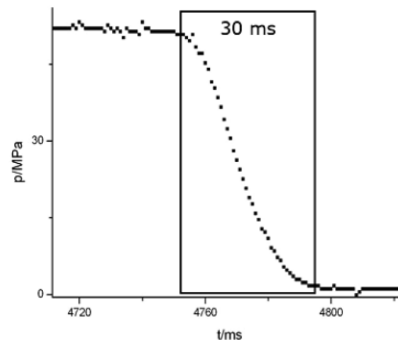


Abbildung 3.22: **Dauer der Druckflanke.** Messung der Flankendauer in der Drucksprungeinrichtung aus dem Jahre 2002 mittels Sensor 2 (Abbildung 2.21). Quelle Abbildung: [Kre11].

In der hier vorgestellten Drucksprungeinrichtung konnten dagegen die Zeiten, welche für eine Druckänderung, speziell innerhalb der Probe, benötigt werden, signifikant reduziert werden. Mittels Kenntnis über die Schalteigenschaften der Ventile konnte zudem eine vergleichbare Flankenbreite in beide Richtungen der Druckänderung erreicht werden.

Als problematisch stellte sich allerdings ein zeitlicher Versatz der Flanke t_o^{eff} heraus. Da dieser Effekt, wie bereits in Abschnitt 3.2.4.1 erörtert, nicht mit der Laufzeit der Flanke innerhalb der Leitung zu erklären ist, lässt er sich nur auf eine endliche Verzögerung der Ventilöffnung zum Ventilsteuerimpuls zurückführen. Die Ursache hierfür liegt in der endlichen Zeit des Luftdruckaufbaus in der Ventiltriebchamber und weniger im Aufbau in der Steuerleitung vom magnetopneumatischen Aktuator zum Ventil selbst. Dies zeigte Modifikationen an den Versorgungsleitungen relevanter Ventile, welche an dem zeitlichen Versatz zwischen Steuerimpuls und Ventilöffnung keine signifikanten Änderungen hervorzurufen vermochten. Die Varianz dieses Effektes bezüglich unterschiedlicher Druckdifferenzen und Richtungen deutet auf eine vom hydraulischen Hochdruck beeinflusste Nadelbewegung im Ventil hin. Wenn dem so ist, könnte ein automatischer, softwarebasierter Anlernprozess seitens der Drucksprungeinrichtung diesen Effekt zu kompensieren helfen. Die Anlage wäre dadurch in der Lage, eine Kalibrierung der Schaltzeiten der Ventile auf die aktuellen Bedingungen des jeweiligen Experimentes vorzunehmen.

Ein weiterer Nachteil der Apparatur sind die Teils zu großen Volumina der Verbindungsleitungen. Diese haben keinen Einfluss auf die Flankenform, da sie allesamt dem effektiven Druckspeichervolumen zuzurechnen sind, welches beim Öffnen des Sprungventils auf das Probenvolumen einwirkt. Sie limitieren aber die absolute Höhe des zu erreichenden Druckes in der Probe. Dieser Zusammenhang ist sehr einfach am gezeigten Beispiel des Experimentes eines Sprungs von atmosphärischen 0,1 MPa auf 64 MPa nachzuvollziehen (Abbil-

dung 3.19-oben). Der Ladedruck des Speichers R_1 (Abbildung 3.14) betrug hier 100 MPa. Aus technischen Gründen muss dieser Druck aber vor dem eigentlichen Sprung an das Sprungventil V_7 freigegeben werden. Es ist somit ein weiteres Volumen mit Druck zu beaufschlagen, welches von den Ventilen V_4 , V_5 , V_6 und V_7 begrenzt wird. Am Ende, nach Öffnen des Sprungventils, beträgt der Druck bekanntermaßen 64 MPa. Unter Zugrundelegung einer isothermen Zustandsänderung und mit bekanntem probenseitigen Gesamtvolumen von 0,6 ml errechnet sich das Volumen der Zuleitungen inklusiver aller Verbindungsstücke aus dem Volumen des Speicher von 27 ml und dem Verhältnis der Drücke somit zu 15 ml. Um also den Lade- und den tatsächlichen Probendruck einander anzunähern, wären zum einen größere Druckspeicher oder kleinere Verbindungsleitungen wünschenswert. Erste, dahingehende Vorkehrung, wurden bereits zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Dissertation getroffen.

Desweiteren sind mit der bereits installierten Hardware weitere Entwicklungsschritte aufzuzeigen:

Denkbar wäre ein Zurückspringen auf das Anfangsdruckniveau innerhalb der Pulssequenz. Dafür müsste allerdings ein zweites Sprungventil analoger Bauart zu V_7 (Abbildung 3.14) angeschafft werden. Dies würde ein rechteckiges Druckprofil innerhalb eines Experimentes ermöglichen.

Desweiteren ließe sich die Anlage mit weiteren Druckspeichern erweitern, was die Möglichkeit weiterer Druckniveaus schaffen würde.

4 DRUCKANTWORTEN VON MODELLPEPTIDEN

Die Energielandschaft eines thermodynamischen Ensembles lässt sich durch Variation des Parameters Druck auf reversible Art und Weise erkunden. Diese energetischen Veränderungen beeinflussen alle NMR Parameter, wobei aber die chemische Verschiebung äußerst präzise messbar ist. Aufgrund der in hohem Maße anisotropen Kompressibilität von Proteinen ergeben sich starke Schwankungen in der beobachteten Änderung der chemischen Verschiebung von Atom zu Atom. In relativ starren Proteinen, beispielsweise in *BPTI* (*Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*), zeigen nahezu alle Atome eine überwiegend lineare Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung [LiH98]. Im Gegensatz dazu finden sich in Proteinen, welche in Lösung mehrere Konformationen aufweisen, üblicherweise starke Nichtlinearitäten in der druckinduzierten Änderung der chemischen Verschiebung. Als ein erstes Beispiel hierzu gilt *HPr* (*Histidine Containing Protein*) von *Staphylococcus carnosus*, welches eine von der Linearität stark abweichende Druckantwort zeigt. Diese Verschiebungen werden normalerweise in Regionen des Proteins beobachtet, die an der Bindung von kleinen Liganden oder anderen Proteinen beteiligt sind. Bei *HPr* sind diese eine Schleife im aktiven Zentrum um His₁₅ (Schnittstelle mit Enzym *I* und Enzym *II*) und die regulatorische Helix B (Schnittstelle mit *HPr*-Kinease/Phosphatase) [Kaloo]. Diese Regionen sollten

sich ebenfalls durch eine erhöhte innere Mobilität [Bal91] und Kompressibilität auszeichnen, da exakt hier strukturelle Übergänge möglich sein sollten.

Es ist von essentieller Bedeutung für die Interpretation der Daten von Proteinen, triviale druckinduzierte Änderungen der chemischen Verschiebung, wie sie auch in ungefalteten Peptiden auftreten würden, von solchen zu separieren, welche auf strukturelle oder funktionale Modifikationen hindeuten. Am effizientesten ist diese Korrektur durch einfaches Subtrahieren der relativ kleinen Druckabhängigkeiten von Modellpeptiden von den Messdaten zu erreichen. Solche intrinsischen Werte, welche der Aminosäure selbst innewohnen, wenn sie sich innerhalb einer Polypeptidkette befindet, bezeichnet man als Random-Coil (statistisches Knäul). Wie der Begriff bereits impliziert, treten diese Eigenschaften ohne Gegenwart einer Proteinfaltung zutage.

Eine solche Korrektur wurde bereits früher auf die Druckantwort des *humanen Prionen-Proteins* [Kre07] angewandt und half bei der Identifizierung von Bereichen im ungeordneten N-Terminus des Proteins, welche noch eine restliche Sekundärstruktur aufwiesen. Hierfür wurden die bis dato einzig bekannten [Arno2b] ^1H Druckkoeffizienten verwendet. Teil der vorliegenden Arbeit ist es nun, sowohl ^{15}N chemische Verschiebungen, als auch eine Präzisierung der ^1H Daten aller 20 kanonischen, proteinogenen Aminosäuren zu liefern. Diese intrinsischen Werte wurden in ungefalteten Tetrapeptiden Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ (Abbildung 4.1) gemessen, wobei an Position 3 (Xxx) alle kanonischen Aminosäuren permutiert wurden. Die N- und C-terminal ungeschützte Variante Gly-Gly-Xxx-Ala wurde bereits von Wüthrich und Bundi [Bun79a] als Random-Coil-Modellpeptid eingeführt und auch in der Arbeit von Arnold et al. [Arno2b] zur ersten Bestimmung der Protonendaten verwendet. Auf einen Vergleich mit eben dieser Studie soll im Diskussionsteil dieses Kapitels genauer eingegangen werden.

4.1 Materialien und Methoden

Die für die Untersuchungen der Druckantworten der ungefalteten Tetrapeptide durchgeführten NMR-spektroskopischen Experimente sowie die für die Synthese dieser Modellsysteme benötigten Reagenzien werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Ebenso wird die exakte Probenzusammensetzung erläutert. Desweiteren wird hier auf die genaue Analyse der Daten eingegangen.

4.1.1 Synthese der Peptide

^{15}N und ^{13}C isotoopenmarkierte Aminosäuren mit N-terminaler Fmoc-Schutzgruppe (N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl) wurden von der Firma *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, USA) gekauft. Der gleichmäßige Anreicherungsgrad der Isotope lag bei mindestens 98 %. Die Seitenketten waren wie folgt geschützt: Pbf (Arg), Trt (Asn, Gln, His), Boc (Lys, Trp), tBu (Ser, Thr, Tyr) und OtBu (Asp, Glu). Alle für die Synthese benötigten Lösungsmittel und Reagenzien wurden bei der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) gekauft.

Die Tetrapeptide Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ (Abbildung 4.1) wurden mittels Festphasensynthese synthetisiert (Dr. Edson Crusca Jr., Physikalisches Institut von Sao Carlos, Universität Sao Paulo, Sao Carlos, Brasilien), wobei nur an der Xxx-Position die doppelt isotopenangereicherten Aminosäuren zum Einsatz kamen. Die N-terminalen Schutzgruppen und diejenigen der Seitenketten wurden simultan entfernt. Nach dem Fertigstellen des Peptidrückgrates wurde der N-Terminus acetyliert und der C-Terminus mit einer Aminogruppe versehen (Abbildung 4.1). Die Reinheit aller Peptide wurde durch Elektrosprayionisations-Massenspektroskopie (ESI-MS) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) bestätigt (Dr. Edson Crusca Jr.).

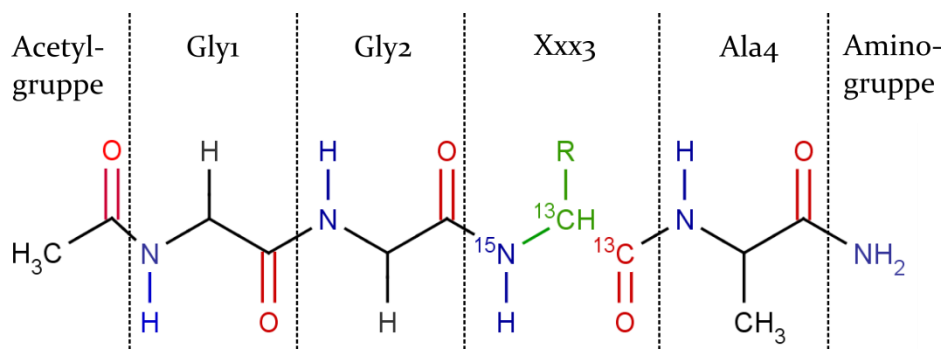


Abbildung 4.1: **Modellpeptide.** Schema der als Modellsystem benutzten Tetrapeptide zur Bestimmung von Random Coil Werten. Die N (links) - und C (rechts) - terminalen Schutzgruppen bewirken eine Reduktion des Einflusses des pH-Wertes der Lösung auf die Eigenschaften des Peptids. Die 20 Peptide unterscheiden sich in Position 3 (Xxx3), an der nacheinander alle 20 kanonischen, proteinogenen Aminosäuren bei der Synthese zum Einsatz kamen. Somit stellt der jeweilige Rest (R) der untersuchten Aminosäure, welcher auch als deren Seitenkette bezeichnet wird, die einzige Variation der Proben dar (vergleiche Abbildung 4.2).

4.1.2 Probenpräparation

Die Peptidkonzentration aller Proben betrug 5 mM in wässriger Lösung aus 90 % H₂O und 10 % D₂O. Als pH-Puffer enthielten alle Proben zusätzlich 20 mM perdeutrieretes Tris-HCL (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan Hydrochlorid) sowie 0,5 mM DSS (4,4-Dimethyl-4-Silapentan-Sulfonsäure) als internem Standard zur Referenzierung der chemischen Verschiebung. Der pH-Wert wurde mittels adäquater Mengen NaOD und DCl auf 6,7 eingestellt und mit einer Hamilton Spintrode an einem Beckman Coulter pH-Meter überprüft. Nur das Peptid Ac-Gly-Gly-His-Ala-NH₂ wurde bei pH 4,0 und pH 8,5 gemessen. Der pH-Wert wurde nicht zusätzlich um den Deuterium-Isotopen-Effekt korrigiert.

4.1.3 NMR-spektroskopische Messungen und Datenauswertung

Alle Messungen wurden an einem 800-MHz-Avance-NMR-Spektrometer (*Bruker Biospin GmbH*, Rheinstetten, Deutschland) mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) bei einer Temperatur von 283 K durchgeführt. Das magnetische Feld wurde mit dem Signal von D₂O stabilisiert. Eine Temperaturkalibrierung wurde vor jedem Probentausch durch das Messen der Differenz der Protonen-Resonanzlinien der Hydroxyl- und Methylgruppe von 100 % Methanol gemäß [Rai79] durchgeführt.

Die Resonanzen von ¹⁵N wurden indirekt über eine ¹H-¹⁵N-HSQC-Pulssequenz (*Hetero Single Quantum Coherence*) (*Bruker* Nomenklatur: *hsqcetf3gp*) ohne ¹⁵N Entkopplung [Dav92] in der direkten Dimension detektiert.

Die Stickstoffresonanzen des Rückgrates von Histidin bei pH 8,5 sowie von Prolin wurden mittels einer HA(CA)N-Pulssequenz gemäß [Kano0] und [Wan95] gemessen. Hierbei wird der Polarisationstransfer vom H^α-Proton zum Rückgrat ¹⁵N Kern über das ¹³C^α und wieder zurück erreicht. Zusätzlich kam diese Pulssequenz bei der Histidin Seitenkette bei pH 4,0 zum Einsatz. Hier wurde mittels abgewandelter Kopplungskonstanten in den Parametersätzen in Analogie zur Standardmethode über die H^{ε1}- und H^{δ2}-Protonen und deren Kohlenstoff die Polarisation auf die beiden ¹⁵N-Kerne des Imidazolringes übertragen.

In allen diesen zweidimensionalen Spektren wurden in direkter Dimension 65k Datenpunkte bei einer spektralen Weite von 10 ppm aufgenommen, was zu einer digitalen Auflösung von 0,12 Hz führte. In indirekter Dimension wurden 1k Datenpunkte bei einer spektralen Weite von 2 ppm aufgenommen, was hier zu einer digitalen Auflösung von 0,15 Hz führte.

Alle Protonenresonanzen wurden zusätzlich mit einer PURGE-Sequenz (*Presaturation Utilizing Relaxation Gradients and Echoes*) [Simo5] bestimmt (Abbildung 4.2). Hier wurden 524k Datenpunkte bei einer spektralen Weite von 12 ppm aufgenommen. Somit betrug die digitale Auflösung der Experimente 0,02 Hz und alle Resonanzen wurden auf den internen Standard DSS (4,4-Dimethyl-4-Silapentan-Sulfonsäure) referenziert.

Die chemische Verschiebung von ¹⁵N wurde dann indirekt mittels eines Verhältnisses von ¹⁵N:¹H = 0.101329118 [Wis95] auf DSS referenziert.

Die Datenprozessierung und die spektrale Analyse inklusive der Bestimmung der Resonanzlinien wurden mit *Bruker Topspin 3.2* durchgeführt. Bei der Primärprozessierung wurde für die 1D Experimente ein exponentieller Filter und eine Linienverbreiterung von 0,3 Hz angewandt, bei den 2D Experimenten dagegen ein Gauss-Filter mit einer negativen Linienverbreiterung jeweils in der Größenordnung der ursprünglichen Linienbreite in beiden Dimensionen. Das Fitten der Daten wurde mit *QtiPlot 0.9.8* durchgeführt unter Verwendung eines skalierten Levenberg-Marquardt-Algorithmus mit instrumenteller Gewichtung auf die Fehlergrenzen der verwendeten Daten, welche sich durch die digitale Auflösung der Experimente ergaben. Hier wurde ein Toleranzniveau von 0,0001 verwendet. Alle Fehlergrenzen der gefitteten Parameter beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %.

4.2 Ergebnisse

Zur Gewinnung von Random-Coil-Werten wurden die chemischen Verschiebungen aller ^1H und ^{15}N sowie die J_{NH} -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen der 20 kanonischen, proteinogenen Aminosäuren, jeweils an Position 3 in ungeordneten, gestreckten Tetrapeptiden, analysiert. Diese waren N-terminal durch eine Acetylgruppe und C-terminal durch eine Aminogruppe geschützt (Abbildung 4.2). Alle 20 Peptide der Form Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ wurden in einem Druckbereich von 0,1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa vermessen (Abbildung 4.3). Die Temperatur betrug 283 K, der pH-Wert 6,7. Druckantworten von Modellpeptiden hängen nur dann signifikant vom pH-Wert ab, wenn dieser im Experiment in der Nähe des pK-Wertes der Seitenkette liegt [Arnoz]. Diese Bedingung war nur bei Histidin gegeben. Aufgrund des pK-Wertes der Histidin Seitenkette von 7,0

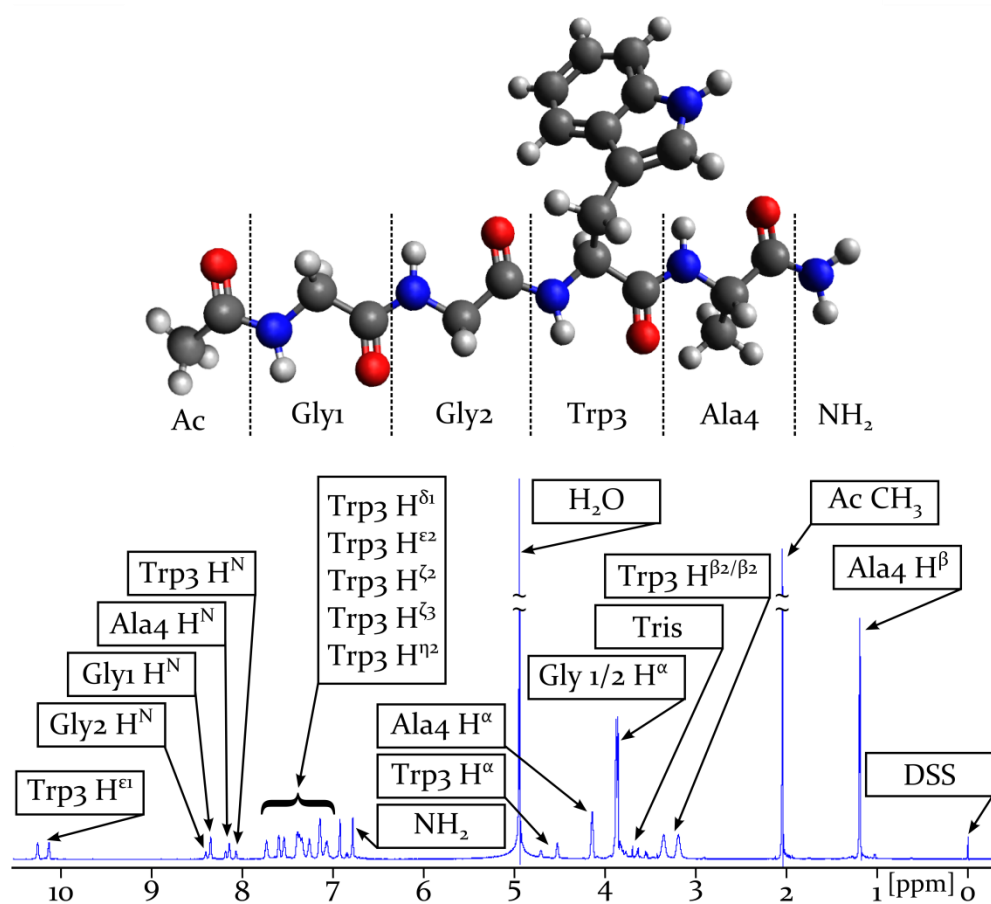


Abbildung 4.2: Zuordnung der Resonanzen des Trp enthaltenden Peptids. ^1H -NMR-Spektrum von 5 mM Ac-Gly-Gly-Trp-Ala-NH₂ bei 800 MHz Resonanzfrequenz, 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM DSS bei pH 6,7 sowie einer Temperatur von 283 K und einem Druck von 0,1 MPa. Die Resonanzen von Trp3 spalten aufgrund der Isotopenanreicherung von ^{13}C und ^{15}N in je zwei Linien auf, deren Abstand die $J_{\text{N-H}}$ beziehungsweise $J_{\text{C-H}}$ -Kopplungskonstante darstellt. Farbzuordnung im Molekülmodell: Wasserstoff hellgrau, Kohlenstoff dunkelgrau, Stickstoff blau, Sauerstoff rot.

[Bun79a] wurde das Peptid Ac-Gly-Gly-His-Ala-NH₂ bei pH 4,0 und pH 8,5 gemessen. Die hier angegebenen Werte beziehen sich somit auf einen vollständig deprotonierten beziehungsweise vollständig protonierten Imidazolring.

In den Spektren wiesen die Resonanzfrequenzen der Protonen der Aminosäure Xxx₃ aufgrund der vollständigen Isotopenanreicherung jeweils ein Duplett auf. Die Weite dieser Aufspaltung ist durch die zugehörige Kopplungskonstante $^1J_{X-H}$ gegeben, wobei das X entweder durch C (Kohlenstoff) oder N (Stickstoff) zu ersetzen ist (Abbildungen 4.2 und 4.3)

4.2.1 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung

Die beobachteten druckinduzierten, nichtlinearen Änderungen der chemischen Verschiebung wurden mittels Gleichung 2.12 gefittet. Hierbei ist der Koeffizient nullter Ordnung δ_0 als die chemische Verschiebung bei atmosphärischem Druck von 0,1 MPa zu verstehen. Der Koeffizient B_1 stellt deren dominante, lineare Änderung erster Ordnung mit dem Druck dar. Der Druckkoeffizient zweiter Ordnung B_2 beschreibt die Nichtlinearität, also die Krümmung des Druckverhaltens.

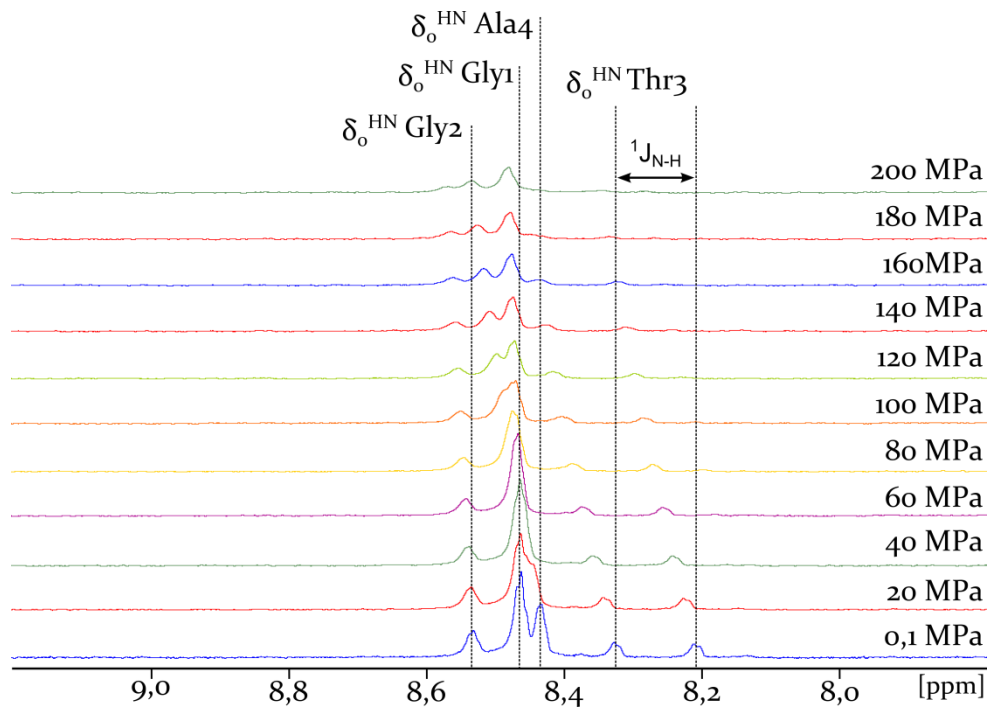


Abbildung 4.3: **Druckabhängige Resonanz der Amidprotonen.** ^1H Spektren der Rückgrat Amid-Region (H^{N}) von 5 mM Ac-Gly-Gly-Thr-Ala-NH₂ bei 800 MHz Resonanzfrequenz. Nur Thr₃ zeigt ein Duplett, was an der ^{15}N Isotopenanreicherung liegt. Alle Resonanzen verschieben sich mit steigendem Druck in Richtung Tieffeld (nach links). Die Probe enthielt zusätzlich 20 mM Tris-HCl in 10 % D₂O / 90 % H₂O. Experimente bei pH 6,7 und einer Temperatur von 283 K.

4.2.1.1 Änderung des pH-Wertes

Um bei der späteren Analyse der Ergebnisse einen Einfluss der druckabhängigen Änderung des pH-Wertes auszuschließen, wurde zuerst das Signal des pH-Puffers Tris-HCl einer Untersuchung unterzogen. Die Differenzen der Resonanzen des deuterierten Tris bei 0,1 MPa und 200 MPa ließen Rückschlüsse auf die Änderung des pH-Wertes in der Probe zu [Hub11]. Somit konnte das schwache ^1H -Restsignal (Abbildung 4.2) von Tris als pH-Sonde verwendet werden.

Xxx	δ (TRIS)		ΔpH
	0,1 MPa [ppm]	200 MPa [ppm]	
Ala	3.72	3.71	0.01
Arg	3.72	3.71	-0.18
Asn	3.72	3.71	-0.02
Asp	3.72	3.71	0.09
Cys	3.72	3.71	-0.01
Gln	3.72	3.71	-0.01
Glu	3.72	3.71	0.12
Gly	3.72	3.71	0.06
His ^a	3.67	3.67	-0.07
Ile	3.72	3.71	-0.03
Leu	3.72	3.71	0.05
Lys	3.72	3.71	0.10
Met	3.72	3.71	0.07
Phe	3.72	3.71	-0.01
Pro	3.72	3.71	0.04
Ser	3.72	3.71	0.01
Thr	3.72	3.71	-0.06
Trp	3.72	3.71	-0.03
Tyr	3.72	3.71	0.06
Val	3.72	3.71	0.09
Mittel ^b	3,72 (0,01)	3,71 (0,01)	0,01 (0,07)

Tabelle 4.1: Druckabhängigkeit des Signals von Tris. Die Proben enthielten 5 mM Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ mit 20 mM Tris-HCl und 0,1 mM DSS in 10 % D₂O / 90 % H₂O bei pH 6,7. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 283 K und Drücken von 0,1 MPa und 200 MPa durchgeführt. Die Differenz der pH-Werte zwischen atmosphärischem und höchstem Druck ΔpH berechnen sich aus der Differenz der Resonanzlinien nach [Hub11]. ^aMessung durchgeführt bei pH 8,5; ^bMittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern.

Es zeigte sich, dass von einer mittleren Erniedrigung des pH-Wertes um 0,01 Einheiten auszugehen war (Tabelle 4.1). Dies ist auf die geringe Pufferkapazität bei pH 6,7 des verwendeten Tris-HCl zurückzuführen. Ein Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie wird im Diskussionsteil dieses Kapitels gegeben werden.

4.2.1.2 Amidprotonen des Rückgrates

Die chemische Verschiebung von Histidin wurde nur bei pH 4,0 gemessen (Tabelle 4.2), da bei pH 8,5 der starke chemische Austausch des Protons mit dem umgebenden Wasser eine Detektion unmöglich machen würde. Wegen des pK-Wertes der Histidin Seitenkette von 7,0 in diesem Tetrapeptid [Bun79a], beziehen sich die hier angegebenen Druckkoeffizienten auf einen völlig protonierten Imidazolring. Bei neutralem pH ist eine hochfeldverschobene Amidprotonen Resonanz zu erwarten [Kja11].

Bedingt durch die unterschiedlichen Druckkoeffizienten erster Ordnung kam es mit steigendem Druck zu teilweisen Überlagerungen anfänglich getrennter Resonanzen. Speziell bei den Amidprotonen von Gly1 und Ala4 war dies oftmals zu beobachten (Tabelle 9.2, Abbildung 4.3). Desweiteren war bei den Amidprotonen der mit dem Druck steigende chemische Austausch mit dem sie umgebenden Wasser zu verzeichnen. Dieser Effekt manifestierte sich in einer Austauschverbreiterung der Signale und damit einhergehend in einer sichtlich sinkenden Signalhöhe (Abbildung 4.3).

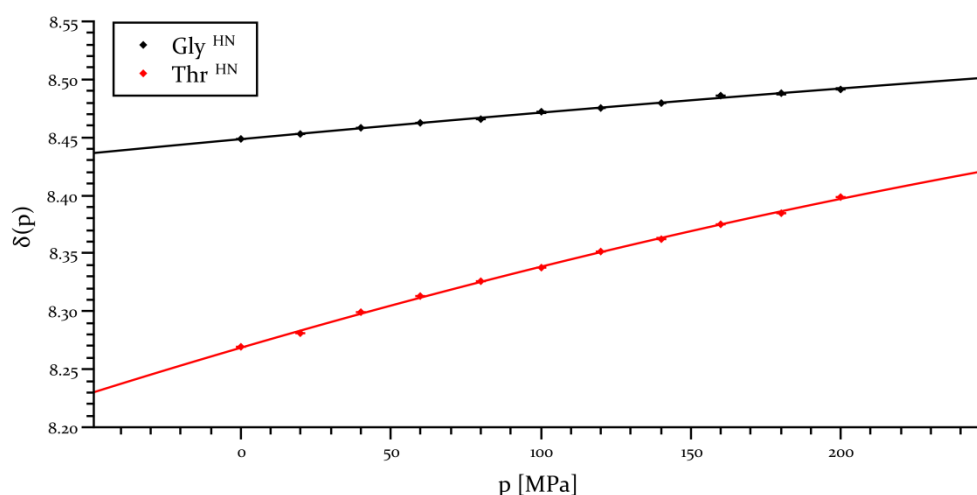


Abbildung 4.4: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Amidprotonen. Druckabhängige chemische Verschiebung von Gly (schwarz), welches den kleinsten Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1^{HN} aller Amidprotonen aufweist und Thr (rot) mit der hier größten Druckabhängigkeit erster Ordnung. Die eingezeichneten Fehler entsprechen der digitalen Auflösung des NMR-Experimentes, sind aber hier nicht zu erkennen, da sie kleiner als die Punkte selbst sind. Durchgezogene Linien: Fit der Daten mit Gleichung 2.12 unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 4.2, jeweils mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 > 0,99$.

Generell werden die größten druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebung im Protein Rückgrat für die Amidgruppen erwartet, weil diese stark an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Es ergab sich bei der Analyse der druckabhängigen Random-Coil-Werte hier eine durchschnittliche chemische Verschiebung bei Atmosphärendruck δ_0^{HN} von 8,3486 ppm (Tabelle 4.2). Mit einer Standardabweichung von nur 0,1170 ppm lagen alle Werte sehr nahe beieinander. Die am stärksten Richtung Tieffeld verschobene Resonanz wurde für Glu mit $8,5376 \pm 0,0011$ ppm gemessen, die am weitesten in Richtung

Xxx	δ_o^{HN} [ppm]	B_1^{HN} [ppm GPa ⁻¹]	B_2^{HN} [ppm GPa ⁻²]
Ala	8,3671 ± 0,0007	0,451 ± 0,016	-0,15 ± 0,08
Arg	8,3440 ± 0,0009	0,481 ± 0,022	-0,22 ± 0,10
Asn	8,5001 ± 0,0018	0,495 ± 0,029	-0,42 ± 0,14
Asp	8,4309 ± 0,0008	0,556 ± 0,019	-0,48 ± 0,09
Cys	8,4174 ± 0,0004	0,554 ± 0,010	-0,49 ± 0,05
Gln	8,4315 ± 0,0011	0,438 ± 0,026	-0,17 ± 0,13
Glu	8,5376 ± 0,0011	0,254 ± 0,016	-0,03 ± 0,08
Gly	8,4485 ± 0,0005	0,239 ± 0,012	-0,10 ± 0,06
His ^a	8,4835 ± 0,0005	0,506 ± 0,012	-0,47 ± 0,06
Ile	8,1531 ± 0,0013	0,644 ± 0,029	-0,64 ± 0,14
Leu	8,2775 ± 0,0011	0,517 ± 0,025	-0,50 ± 0,12
Lys	8,3170 ± 0,0009	0,549 ± 0,020	-0,49 ± 0,10
Met	8,3975 ± 0,0009	0,489 ± 0,021	-0,31 ± 0,10
Phe	8,2614 ± 0,0009	0,550 ± 0,021	-0,68 ± 0,10
Ser	8,4357 ± 0,0023	0,640 ± 0,054	-0,65 ± 0,26
Thr	8,2685 ± 0,0010	0,755 ± 0,024	-0,56 ± 0,11
Trp	8,1286 ± 0,0010	0,582 ± 0,023	-0,42 ± 0,11
Tyr	8,1927 ± 0,0022	0,668 ± 0,052	-0,82 ± 0,25
Val	8,2315 ± 0,0007	0,578 ± 0,016	-0,21 ± 0,08
Mittel ^b	8,3486 (0,1170)	0,523 (0,122)	-0,41 (0,21)

Tabelle 4.2: Druckabhängigkeit der Rückgrat $^1H^N$ chemischen Verschiebungen. Die Proben enthielten 5 mM Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ mit 20 mM Tris-HCl in 10 % D₂O / 90 % H₂O bei pH 6,7. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 283 K und Drücken von 0,1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa durchgeführt. δ_o , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung aus Gleichung 2.12. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. ^aMessung durchgeführt bei pH 4,0; ^bMittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern.

Hochfeld verschobene offenbarte Trp mit $8,1286 \pm 0,0010$ ppm (Abbildung 4.2). Der mittlere Druckkoeffizient erster Ordnung B_1^{HN} lag bei $0,523$ ppm GPa⁻¹. Die Resonanzen aller Amidprotonen verschoben sich mit steigendem Druck zunehmend in Richtung Tieffeld, was durch positive Werte aller B_1^{HN} zum Ausdruck kam (Abbildung 4.3, Tabelle 4.2). Mit einer Standardabweichung von $0,122$ ppm GPa⁻¹ zeigte sich hier bereits eine größere Varianz des Verhaltens als bei der chemischen Verschiebung alleine. Die stärkste Druckabhängigkeit erster Ordnung war bei Thr (Abbildung 4.3) mit $0,755 \pm 0,024$ ppm GPa⁻¹ zu finden, dagegen zeigte Gly mit $0,239 \pm 0,012$ ppm GPa⁻¹ hier die kleinste Änderung der chemischen Verschiebung mit dem Druck (Abbildung 4.4). Der Mittelwert des Druckkoeffizienten zweiter Ordnung B_2^{HN} ließ sich zu $-0,41$ ppm GPa⁻² berechnen. Die Standardabweichung von $0,21$ ppm GPa⁻² verdeutlichte zwar große Unterschiede in der Krümmung des Druckverhaltens, ein wechselndes Vorzeichen von Aminosäure zu Aminosäure konnte hier aber nicht gefunden werden. Somit besaßen alle Amidprotonen einen negativen Druckkoeffizienten zweiter Ordnung, was in Kombination mit dem positiven Vorzeichen von B_1^{HN} zu einem sättigenden

Verlauf der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung führt. Die stärkste Krümmung von $-0,82 \pm 0,25 \text{ ppm GPa}^{-2}$ fiel bei Tyr auf, nahezu linear mit dem Druck verschiebt sich die Resonanz von Glu ($-0,03 \pm 0,08 \text{ ppm GPa}^{-2}$). Allerdings war hier aufgrund des relativ zum Messwert großen Fehlers ein leicht positives B_2^{HN} nicht gänzlich auszuschließen (Tabelle 4.2).

4.2.1.3 H^α -Protonen

Die Random-Coil-Werte der H^α -Protonen wiesen eine wesentlich geringere Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung auf, als dies bei den Amidprotonen der Fall war. Sie zeigten ein durchschnittliches $\delta_o^{H^\alpha}$ von $4,4232 \text{ ppm}$ und wiesen mit einer Standardabweichung von $0,1906 \text{ ppm}$ eine leicht größere Streuung um diesen Mittelwert auf, als dies bei δ_o^{HN} beobachtbar war. Abgesehen von His bei pH 4,0 zeigte Asn mit $4,7178 \pm 0,0005 \text{ ppm}$ bei $0,1 \text{ MPa}$ die stärkste Verschiebung in Richtung Tieffeld, Gly dagegen mit $3,9604 \pm 0,0001 \text{ ppm}$ den am stärksten in Richtung Hochfeld verschobenen Wert. Der Mittelwert des

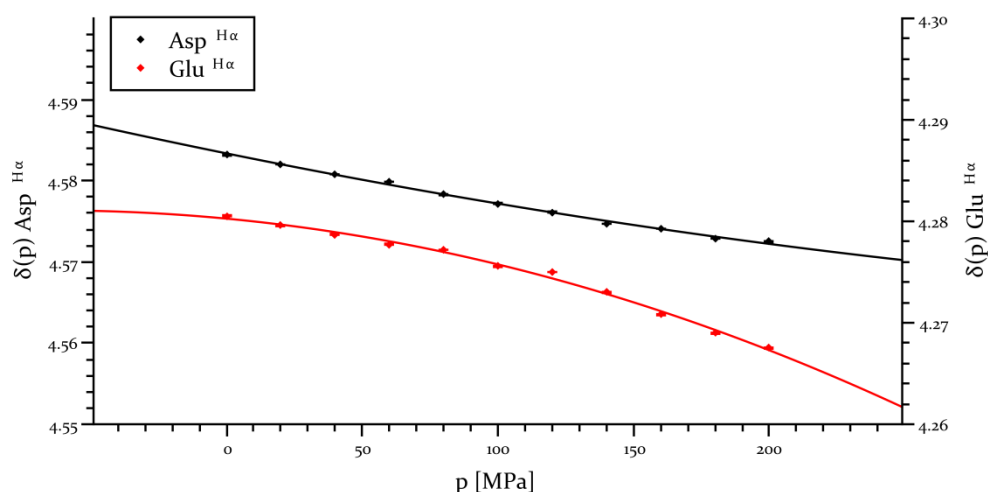


Abbildung 4.5: Krümmungsverhalten der Druckabhängigkeit bei H^α . Druckabhängige chemische Verschiebung von Asp $^{H^\alpha}$ (schwarz) und Glu $^{H^\alpha}$ (rot). Glu besitzt als einzige Aminosäure ein $B_1^{H^\alpha}$ und $B_2^{H^\alpha}$ mit gleichem Vorzeichen, zeigt also kein asymptotisches Verhalten im untersuchten Druckbereich. Die eingezeichneten Fehler entsprechen der digitalen Auflösung des NMR-Experimentes, sind aber hier nicht zu erkennen, da sie kleiner als die Punkte selbst sind. Durchgezogene Linien: Fit der Daten mit Gleichung 2.12 unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 4.3 mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0,99$ (Glu) und $R^2 > 0,99$ (Asp).

Druckkoeffizienten erster Ordnung ließ sich zu $-0,034 \text{ ppm GPa}^{-1}$ berechnen, seine Standardabweichung betrug $0,051 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Bereits hieraus ist ersichtlich, dass bei der chemischen Verschiebung der H^α kein einheitliches Druckverhalten nachweisbar war. Der lineare Koeffizient $B_1^{H^\alpha}$ zeichnete sich folglich durch ein von Aminosäure zu Aminosäure wechselndes Vorzeichen aus. Lediglich Cys, Gly, Pro $_{cis}$, Ser und Thr zeigten, wie die Amidprotonen, eine positive Änderung der chemischen Verschiebung mit steigendem Druck. Allerdings wiesen nahezu alle anderen Aminosäuren dafür ein positives $B_2^{H^\alpha}$ auf, was wiederum ein sättigendes Verhalten für extrem hohe Drücke vermuten ließ. Die einzige Ausnahme von

Xxx	$\delta_o^{H\alpha}$ [ppm]	$B_1^{H\alpha}$ [ppm GPa ⁻¹]	$B_2^{H\alpha}$ [ppm GPa ⁻²]
Ala	4,2967 ± 0,0002	-0,028 ± 0,004	0,025 ± 0,017
Arg	4,3271 ± 0,0004	-0,070 ± 0,009	0,095 ± 0,042
Asn	4,7178 ± 0,0005	-0,055 ± 0,012	0,024 ± 0,056
Asp	4,5833 ± 0,0003	-0,064 ± 0,006	0,030 ± 0,029
Cys	4,5245 ± 0,0001	0,037 ± 0,003	-0,058 ± 0,016
Gln	4,3310 ± 0,0002	-0,055 ± 0,006	0,062 ± 0,027
Glu	4,2803 ± 0,0003	-0,025 ± 0,006	-0,198 ± 0,030
Gly	3,9604 ± 0,0001	0,077 ± 0,003	-0,087 ± 0,015
His ^a	4,7189 ± 0,0003	-0,046 ± 0,006	0,033 ± 0,029
His ^b	4,5733 ± 0,0006	-0,048 ± 0,014	0,074 ± 0,069
Ile	4,1684 ± 0,0004	-0,051 ± 0,010	0,052 ± 0,049
Leu	4,3367 ± 0,0007	-0,132 ± 0,016	0,107 ± 0,076
Lys	4,3151 ± 0,0002	-0,082 ± 0,005	0,078 ± 0,025
Met	4,4800 ± 0,0002	-0,110 ± 0,005	0,142 ± 0,023
Phe	4,5989 ± 0,0002	-0,048 ± 0,005	0,077 ± 0,022
Pro _{cis}	4,6116 ± 0,0002	0,036 ± 0,004	-0,036 ± 0,019
Pro _{trans}	4,40246 ± 0,00002	-0,0061 ± 0,0004	0,004 ± 0,002
Ser	4,4498 ± 0,0004	0,026 ± 0,009	-0,028 ± 0,041
Thr	4,3393 ± 0,0002	0,044 ± 0,004	-0,009 ± 0,020
Trp	4,6210 ± 0,0004	-0,057 ± 0,009	0,033 ± 0,043
Tyr	4,5389 ± 0,0004	-0,077 ± 0,010	0,221 ± 0,048
Val	4,1341 ± 0,0001	-0,013 ± 0,001	-0,002 ± 0,007
Mittel ^c	4,4232 (0,1906)	-0,034 (0,051)	0,029 (0,083)

Tabelle 4.3: Druckabhängigkeit der Rückgrat ¹H^α chemischen Verschiebungen. Probenzusammensetzung und Bedingungen der Messungen wie in Tabelle 4.2. δ_o , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung aus Gleichung 2.12. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. ^aMessung durchgeführt bei pH 4,0; ^bMessung durchgeführt bei pH 8,5; ^cMittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern.

diesem asymptotischen Verhalten stellte bei den H^α-Protonen Glu dar. Hier besaßen sowohl $B_1^{H\alpha}$ als auch $B_2^{H\alpha}$ ein negatives Vorzeichen (Abbildung 4.5). Die am stärksten negative, lineare Änderung der chemischen Verschiebung fand sich bei Leu mit $-0,132 \pm 0,016$ ppm GPa⁻¹, die am stärksten positive bei Gly mit $0,077 \pm 0,003$ ppm GPa⁻¹. Den geringsten Absolutwert der Druckabhängigkeit weist Pro_{trans} mit $-0,0061 \pm 0,0004$ ppm GPa⁻¹ auf. Die Nichtlinearität der druckinduzierten Änderung der chemischen Verschiebung offenbarte bei den

H^α -Protonen einen Mittelwert von $0,029 \text{ ppm GPa}^{-2}$ und eine Standardabweichung von $0,083 \text{ ppm GPa}^{-2}$. Die stärkste Rechtskrümmung wies Glu mit $-0,189 \pm 0,030 \text{ ppm GPa}^{-2}$ auf (Abbildung 4.5), die stärkste Linkskrümmung Tyr mit $0,221 \pm 0,048 \text{ ppm GPa}^{-2}$. Die betragsmäßig kleinsten Nichtlinearitäten ließen sich bei Val und Pro_{trans} mit $-0,002 \pm 0,007 \text{ ppm GPa}^{-2}$ und $0,004 \pm 0,002 \text{ ppm GPa}^{-2}$ nachweisen (Tabelle 4.3).

4.2.1.4 Protonen der Seitenketten

Die Größen der druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen der H^β -Protonen zeigten ein den H^α -Protonen ähnliches Verhalten. Die durchschnittliche Resonanz bei atmosphärischem Druck errechnete sich zu $2,4951 \text{ ppm}$ mit einer deutlichen Standardabweichung aller Aminosäuren von $0,6808 \text{ ppm}$. Den am stärksten in Richtung Hochfeld verschobenen Wert wies die Methylgruppe von Ala mit $1,3915 \pm 0,0001 \text{ ppm}$ auf. Dem gegenüber lag Thr mit $4,2551 \pm 0,0001 \text{ ppm}$. Der mittlere Koeffizient erster Ordnung $B_1^{H^\beta}$ lag bei $-0,024 \text{ ppm GPa}^{-1}$ und seine Standardabweichung ergab sich zu $0,060 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Somit war auch bei den H^β -Protonen ein wechselndes Vorzeichen des linearen Koeffizienten sichtbar, mit einer sich mit steigendem Druck am stärksten in Richtung Tieffeld verschiebenden Resonanz bei H^{β_2/β_3} von Asp mit $B_1^{H^{\beta_2/\beta_3}} = 0,083 \pm 0,008 / 0,073 \pm 0,007 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Die größte negative Änderung fand sich bei einer der beiden nicht stereospezifisch zugeordneten Resonanzen von Glu mit einem linearen Koeffizienten von $-0,190 \pm 0,035 \text{ ppm GPa}^{-1}$.

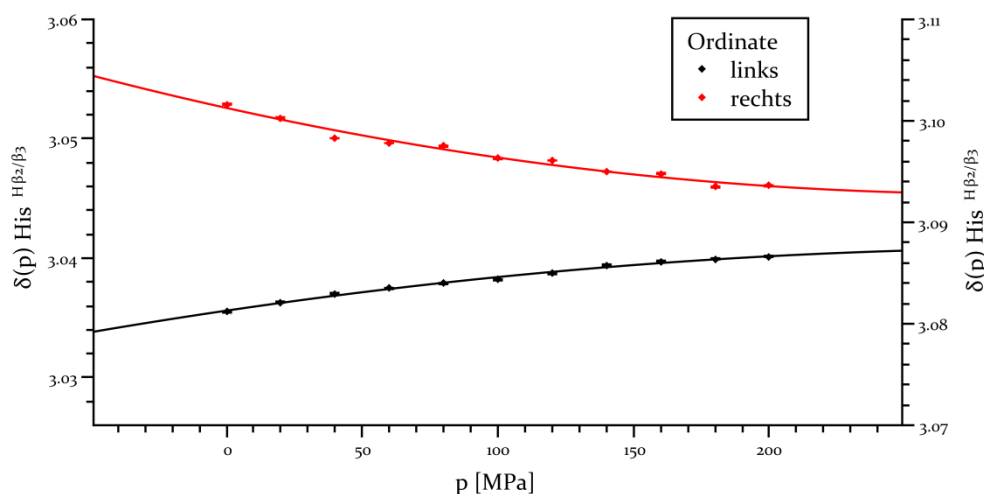


Abbildung 4.6: **Asymptotische Druckabhängigkeit bei $His^{H^{\beta_2/\beta_3}}$.** Druckabhängige chemische Verschiebung von $His^{H^{\beta_2/\beta_3}}$ ohne stereospezifische Zuordnung bei pH 8,5. Beide Resonanzen verschieben sich gegenläufig mit steigendem Druck, aber jeweils mit asymptotischem Verhalten im untersuchten Druckbereich. Die eingezeichneten Fehler entsprechen der digitalen Auflösung des NMR-Experimentes, sind aber hier nicht zu erkennen, da sie kleiner als die Punkte selbst sind. Durchgezogene Linien: Fit der Daten mit Gleichung 2.12 unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 4.4 mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0,99$ (schwarz) und $R^2 = 0,97$ (rot).

Xxx		δ_o [ppm]	B_1 [ppm GPa ⁻¹]	B_2 [ppm GPa ⁻²]
Ala	H ^{β}	1,3915 \pm 0,0001	-0,022 \pm 0,001	0,02 \pm 0,01
Arg	H ^{β_2/β_3}	1,7693 \pm 0,0002	-0,026 \pm 0,005	0,004 \pm 0,024
		1,8740 \pm 0,0002	-0,077 \pm 0,005	0,03 \pm 0,02
Asn ^a	H ^{β_2}	2,8389 \pm 0,0005	0,042 \pm 0,011	-0,13 \pm 0,06
	H ^{β_3}	2,7462 \pm 0,0006	0,072 \pm 0,014	-0,12 \pm 0,07
Asp	H ^{β_2/β_3}	2,6226 \pm 0,0003	0,083 \pm 0,008	-0,06 \pm 0,04
		2,7042 \pm 0,0003	0,073 \pm 0,007	-0,05 \pm 0,03
Cys	H ^{β_2/β_3}	2,93816 \pm 0,00004	-0,001 \pm 0,001	-0,014 \pm 0,004
Gln ^a	H ^{β_2}	2,1326 \pm 0,0006	-0,099 \pm 0,013	0,09 \pm 0,06
	H ^{β_3}	1,9867 \pm 0,0004	-0,041 \pm 0,010	0,05 \pm 0,05
Glu	H ^{β_2/β_3}	1,9477 \pm 0,0004	0,018 \pm 0,010	-0,11 \pm 0,05
		2,0954 \pm 0,0015	-0,190 \pm 0,035	0,24 \pm 0,17
His ^b	H ^{β_2/β_3}	3,1628 \pm 0,0001	0,020 \pm 0,003	-0,01 \pm 0,01
		3,2844 \pm 0,0004	-0,085 \pm 0,010	0,18 \pm 0,05
His ^c	H ^{β_2/β_3}	3,0356 \pm 0,0005	0,027 \pm 0,012	-0,02 \pm 0,06
		3,1013 \pm 0,0003	-0,059 \pm 0,008	0,10 \pm 0,04
Ile	H ^{β}	1,8805 \pm 0,0003	-0,018 \pm 0,006	0,04 \pm 0,03
Leu	H ^{$\gamma/\beta_2/\beta_3$}	1,5897 \pm 0,0006	0,056 \pm 0,015	-0,17 \pm 0,07
		1,6430 \pm 0,0011	-0,126 \pm 0,025	0,57 \pm 0,12
Lys	H ^{β_2/β_3}	1,7584 \pm 0,0001	-0,041 \pm 0,002	0,02 \pm 0,01
		1,8455 \pm 0,0003	-0,103 \pm 0,007	0,07 \pm 0,03
Met	H ^{β_2/β_3}	2,0041 \pm 0,0008	0,006 \pm 0,018	-0,04 \pm 0,09
Phe	H ^{β_2/β_3}	3,0492 \pm 0,0004	0,013 \pm 0,010	-0,02 \pm 0,05
		3,1289 \pm 0,0003	-0,049 \pm 0,007	0,14 \pm 0,03
Pro _{cis}	H ^{β_2/β_3}	2,3875 \pm 0,0002	-0,052 \pm 0,004	-0,03 \pm 0,02
		2,1611 \pm 0,0001	-0,052 \pm 0,003	-0,03 \pm 0,02
Pro _{trans}	H ^{β_2/β_3}	1,9484 \pm 0,0002	-0,052 \pm 0,005	0,04 \pm 0,02
		2,2909 \pm 0,0004	-0,046 \pm 0,008	0,06 \pm 0,04
Ser	H ^{β_2/β_3}	3,8809 \pm 0,0002	-0,015 \pm 0,005	-0,01 \pm 0,03
Thr	H ^{β}	4,2551 \pm 0,0001	0,001 \pm 0,003	0,06 \pm 0,01
Trp	H ^{β_2/β_3}	3,2770 \pm 0,0003	-0,024 \pm 0,008	0,02 \pm 0,04
Tyr	H ^{β_2/β_3}	2,9716 \pm 0,0004	0,037 \pm 0,010	-0,13 \pm 0,05
		3,0365 \pm 0,0008	-0,090 \pm 0,019	0,34 \pm 0,09
Val	H ^{β}	2,0933 \pm 0,0002	0,007 \pm 0,004	-0,09 \pm 0,02
Mittel ^d		2,4951 (0,6808)	-0,024 (0,060)	0,03 (0,14)

Tabelle 4.4: Druckabhängigkeit der Seitenketten $^1\text{H}^\beta$ chemischen Verschiebungen. Probenzusammensetzung und Bedingungen der Messungen wie in Tabelle 4.2. δ_0 , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung aus Gleichung 2.12. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. ^aStereospezifische Zuordnung nach [Har13]; ^bMessung durchgeführt bei pH 4,0; ^cMessung durchgeführt bei pH 8,5; ^dMittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern.

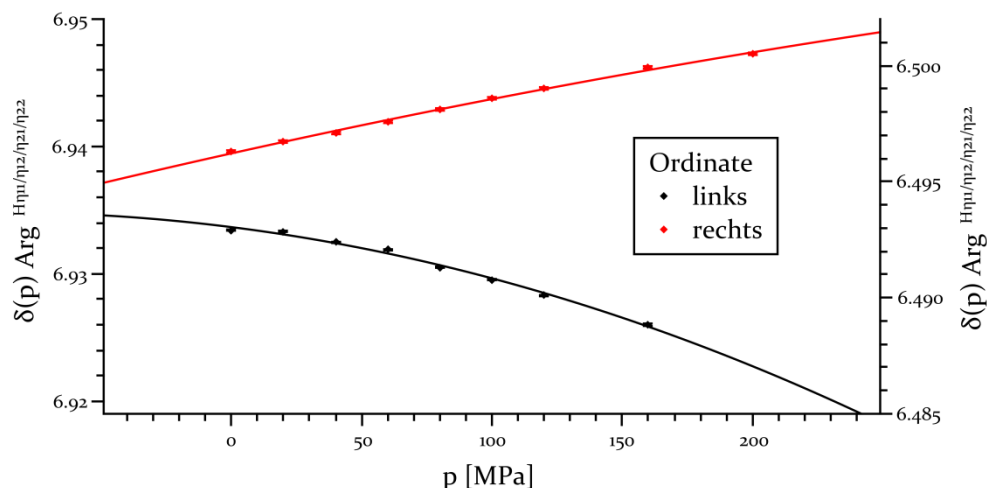


Abbildung 4.7: Druckabhängige chemische Verschiebung von $\text{H}^{\eta_{11}/\eta_{12}/\eta_{21}/\eta_{22}}$ in Arg. Beide, stereospezifisch nicht zugeordnete Resonanzen verschieben sich gegenläufig mit steigendem Druck, aber jeweils mit negativem B_2 . Der bei steigendem Druck zunehmende chemische Austausch erschwerte die Datenerhebung, so dass im Bereich hohen Druckes weniger Messpunkte zu erzielen waren. Die eingezeichneten Fehler entsprechen der digitalen Auflösung des NMR-Experimentes, sind aber hier nicht zu erkennen, da sie kleiner als die Punkte selbst sind. Durchgezogene Linien: Fit der Daten mit Gleichung 2.12 unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 4.5 mit einem Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0,99$ (schwarz) und $R^2 > 0,99$ (rot).

Die andere Resonanz wies eine um den Faktor zehn reduzierte Druckabhängigkeit entgegengesetzten Vorzeichens auf (Tabelle 4.4). Eine ähnliche, in unterschiedliche Richtungen verlaufende Änderung der chemischen Verschiebung der beiden H^β -Protonen war bei His (Abbildung 4.6), Leu, Phe und Tyr nachweisbar (Tabelle 4.4). Als druckunabhängig dagegen erwies sich die Resonanz von Cys mit einem $B_1^{\text{H}^\beta}$ von $-0,001 \pm 0,001 \text{ ppm GPa}^{-1}$ gefolgt von Val mit $0,007 \pm 0,004 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Ein nicht asymptotisches Verhalten, das heißt ein $B_1^{\text{H}^\beta}$ und $B_2^{\text{H}^\beta}$ gleichen Vorzeichens, war bei vier Aminosäuren messbar. Allerdings zeigte sich nur bei Cys eine signifikant nichtsättigende Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der H^β -Protonen. Bei Met und Thr war dies möglicherweise auf das niedrige $B_1^{\text{H}^\beta}$ nahe Null und dem damit verbunden relativ großen Fehler zurückzuführen (Tabelle 4.4). Bei Pro_{cis} dagegen lag der Fehler von $B_2^{\text{H}^\beta}$ nur geringfügig unter dem Wert des Koeffizienten selbst ($-0,03 \pm 0,02 \text{ ppm GPa}^{-2}$). Generell führte die Analyse der Krümmung des Druckverlaufes der chemischen Verschiebung der H^β -Protonen zu einem ähnlich niedrigen Ergebnis ($0,03 \text{ ppm GPa}^{-2}$) wie bereits bei den H^α -Protonen. Allerdings wies hier eine der Resonanzen von Leu mit $0,57 \pm 0,12 \text{ ppm GPa}^{-2}$ einen relativ hohen Wert auf. Eine nahezu linear verlaufende Änderung der chemischen Verschiebung mit dem Druck war bei einigen Aminosäuren messbar (Tabelle 4.4).

Die Analyse der weiteren Protonen in den Seitenketten zeigte erwartungsgemäß, aufgrund der starken strukturellen Unterschiede, eine große Schwankungsbreite von Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebung (Tabelle 4.5). Um diesen Unterschieden zumindest teilweise Rechnung zu tragen, wurden hier die Durchschnittswerte für kohlenstoff- sowie stickstoffgebundene Protonen separat berechnet.

Dennoch offenbarte bereits der Mittelwert von 7,5225 ppm der chemischen Verschiebung bei 0,1 MPa δ_0 der an Stickstoff gebundenen ^1H eine Standardabweichung von 1,0165 ppm. Die am stärksten in Richtung Tieffeld verschobene Resonanz aller Protonen der Modellpeptide war bei H^{E1} von Trp mit $10,1972 \pm 0,0004$ ppm messbar (Abbildung 4.2). Den niedrigsten Wert der chemischen Verschiebung bei Atmosphärendruck offenbarten die beiden nicht stereospezifisch zugeordneten Resonanzen der Guanidinogruppe $\text{H}^{\eta_{11}/\eta_{12}/\eta_{21}/\eta_{22}}$ von Arg mit $6,9337 \pm 0,0002$ / $6,4962 \pm 0,0001$ ppm (Abbildung 4.7).

Die gemessenen Druckkoeffizienten erster Ordnung der stickstoffgebundenen Protonen hatten einen Mittelwert von 0,024 ppm GPa^{-1} . Die Standardabweichung von 0,261 ppm GPa^{-1} offenbarte hier bereits eine Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung sowohl mit positivem als auch negativem Vorzeichen. Das am stärksten negative B_i^{HN} der Seitenketten konnte bei Lys (H^{C}_3) mit $-0,438 \pm 0,034$ ppm GPa^{-1} nachgewiesen werden (siehe hierzu auch Abbildung 4.10), den größten positiven Wert besaß hier die stereospezifisch zugeordnete [Har13] Resonanz von H^{E22} in Gln mit $0,410 \pm 0,011$ ppm GPa^{-1} . Als am wenigsten druckabhängig erwiesen sich die beiden stereospezifisch nicht zugeordneten Resonanzen der Guanidinogruppe $\text{H}^{\eta_{11}/\eta_{12}/\eta_{21}/\eta_{22}}$ von Arg mit entgegengesetztem Vorzeichen ($-0,026 \pm 0,006$ / $0,025 \pm 0,001$ ppm GPa^{-1}). Beide Signale verschieben sich hier gegenläufig mit steigendem Druck, aber jeweils mit einem negativen Wert von B_2 . Somit zeigt lediglich eine Kurve ein asymptotisches Verhalten im untersuchten Druckbereich (Abbildung 4.7).

Ein ähnlich schwankendes Resultat von Aminosäure zu Aminosäure ließ sich beim Druckkoeffizienten zweiter Ordnung nachweisen. Bei einem Mittelwert von 0,07 ppm GPa^{-2} und einer Standardabweichung von 0,26 ppm GPa^{-2} zeigte H^{E1} von Trp den am stärksten linksgekrümmten Verlauf mit $0,63 \pm 0,05$ ppm GPa^{-2} . Die stärkste Rechtskrümmung wurde wiederum H^{E22} in Gln entdeckt ($-0,28 \pm 0,05$ ppm GPa^{-2}). Den betragsmäßig kleinsten Wert von B_2^{HN} der Seitenketten hatte eine der beiden stereospezifisch nicht zugeordneten Resonanzen der Guanidinogruppe von Arg mit $-0,02 \pm 0,01$ ppm GPa^{-2} (Abbildung 4.7). Von den neun gemessenen Resonanzen der stickstoffgebundenen Protonen der Seitenketten wiesen fünf ein asymptotisches Verhalten innerhalb des untersuchten Druckbereiches auf. Diese waren Trp, Lys, Asn $\text{H}^{\delta_{22}}$ und Gln H^{E22} sowie eine der beiden Resonanzen von Arg $\text{H}^{\eta_{11}/\eta_{12}/\eta_{21}/\eta_{22}}$ (Abbildung 4.7).

Die an Kohlenstoff gebundenen Protonen ergaben einen Mittelwert der chemischen Verschiebung von 3,9022 ppm mit einer Standardabweichung (2,7544 ppm) in der selben Größenordnung. Die Werte erstreckten sich von His H^{E1} bei pH 4,0 ($8,5978 \pm 0,0001$ ppm), gefolgt von der selben Resonanz bei pH 8,5 ($7,7021 \pm 0,0026$ ppm) bis zur Methylgruppe H^{δ_2} von Ile ($0,8661 \pm 0,0002$ ppm).

Die Analyse der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von an Kohlenstoff gebundenen Protonen der Seitenketten brachte einen Mittelwert von $-0,58$ ppm GPa^{-1} bei B_i^{HC} hervor, mit einer zugehörigen Standardabweichung von 0,62 ppm GPa^{-1} . Mit $0,137 \pm 0,061$ ppm GPa^{-1} verschob sich die Resonanz von His H^{E1} bei pH 8,5 mit steigendem Druck am stärksten in Richtung Tieffeld. Die größte Änderung der chemischen Verschiebung in entgegengesetzter Richtung zeigte Lys $\text{H}^{\gamma_2/\gamma_3}$ mit $-0,159 \pm 0,012$ ppm GPa^{-1} . Als nahezu unabhängig vom Druck konnte die chemische Verschiebung von Trp $\text{H}^{\text{C}2}$ mit einem B_i von $0,003 \pm 0,006$ ppm GPa^{-1} gemessen werden. Der Druckkoeffizient zweiter Ordnung erbrachte bei

Xxx		δ_o [ppm]	B_1 [ppm GPa ⁻¹]	B_2 [ppm GPa ⁻²]
Arg	H^{γ_2/γ_3}	1,6334 \pm 0,0004	-0,104 \pm 0,009	0,06 \pm 0,04
	H^{δ_2/δ_3}	3,2036 \pm 0,0003	-0,088 \pm 0,007	0,04 \pm 0,03
	H^ϵ	7,2454 \pm 0,0006	-0,144 \pm 0,014	-0,13 \pm 0,07
	$H^{\eta_{11}/\eta_{12}/\eta_{21}/\eta_{22}}$	6,9337 \pm 0,0002	-0,026 \pm 0,006	-0,14 \pm 0,04
		6,4962 \pm 0,0001	0,025 \pm 0,001	-0,02 \pm 0,01
Asn ^a	$H^{\delta_{21}}$	7,6906 \pm 0,0004	0,140 \pm 0,010	0,25 \pm 0,05
	$H^{\delta_{22}}$	6,9899 \pm 0,0004	0,389 \pm 0,010	-0,07 \pm 0,05
Gln ^a	H^{γ_2}	2,3713 \pm 0,0004	-0,037 \pm 0,010	-0,01 \pm 0,05
	H^{γ_3}	2,3713 \pm 0,0004	-0,037 \pm 0,010	-0,01 \pm 0,05
	$H^{\epsilon_{21}}$	7,6390 \pm 0,0004	0,094 \pm 0,010	0,16 \pm 0,05
	$H^{\epsilon_{22}}$	6,9389 \pm 0,0005	0,410 \pm 0,011	-0,28 \pm 0,05
Glu	H^{γ_2/γ_3}	2,3235 \pm 0,0006	-0,078 \pm 0,014	-0,11 \pm 0,07
His ^b	H^{ϵ_1}	8,5978 \pm 0,0001	0,064 \pm 0,003	-0,03 \pm 0,01
	H^{δ_2}	7,2841 \pm 0,0002	0,013 \pm 0,005	0,01 \pm 0,02
His ^c	H^{ϵ_1}	7,7021 \pm 0,0026	0,137 \pm 0,061	0,07 \pm 0,30
	H^{δ_2}	6,9707 \pm 0,0025	0,094 \pm 0,057	-0,23 \pm 0,28
Ile	$H^{\gamma_{12}/\gamma_{13}}$	1,4517 \pm 0,0008	-0,143 \pm 0,018	-0,12 \pm 0,09
		1,1882 \pm 0,0009	-0,117 \pm 0,020	0,18 \pm 0,10
	$(H^{\gamma_2})_3$	0,9237 \pm 0,0002	-0,087 \pm 0,005	0,04 \pm 0,03
	$(H^{\delta_2})_3$	0,8661 \pm 0,0002	-0,099 \pm 0,006	0,07 \pm 0,03
Leu	$H^{\gamma/\beta_2/\beta_3}$	1,6430 \pm 0,0011	-0,126 \pm 0,025	0,57 \pm 0,12
	$(H^{\delta_{11}/\delta_2})_3$	0,9278 \pm 0,0002	-0,072 \pm 0,004	0,08 \pm 0,02
		0,8744 \pm 0,0001	-0,069 \pm 0,003	0,06 \pm 0,02
Lys	H^{γ_2/γ_3}	1,4331 \pm 0,0005	-0,159 \pm 0,012	0,15 \pm 0,06
	H^{δ_2/δ_3}	1,6779 \pm 0,0003	-0,108 \pm 0,007	0,06 \pm 0,03
	$H^{\epsilon_2/\epsilon_3}$	2,9888 \pm 0,0001	-0,071 \pm 0,003	0,03 \pm 0,01
	$(H^\zeta)_3^+$	7,5714 \pm 0,0014	-0,438 \pm 0,034	0,22 \pm 0,16
Met	H^{γ_2/γ_3}	2,6185 \pm 0,0003	-0,123 \pm 0,007	0,11 \pm 0,03
		2,5471 \pm 0,0005	-0,085 \pm 0,011	-0,04 \pm 0,05
	$(H^\epsilon)_3$	2,1002 \pm 0,0001	-0,069 \pm 0,002	0,05 \pm 0,01
Phe	H^{δ_1/δ_2}	7,2765 \pm 0,0003	-0,065 \pm 0,007	0,15 \pm 0,03
	$H^{\epsilon_1/\epsilon_2}$	7,3746 \pm 0,0004	-0,019 \pm 0,008	0,12 \pm 0,04
	H^ζ	7,3458 \pm 0,0004	-0,008 \pm 0,009	0,10 \pm 0,04

XXX		δ_0 [ppm]	B_1 [ppm GPa ⁻¹]	B_2 [ppm GPa ⁻²]
Pro _{cis}	H ^{γ₂/γ₃}	1,8494 ± 0,0003	-0,120 ± 0,007	0,09 ± 0,03
	H ^{δ₂/δ₃}	3,5522 ± 0,0004	-0,046 ± 0,009	-0,13 ± 0,04
Pro _{trans}	H ^{γ₂/γ₃}	2,0214 ± 0,0002	-0,090 ± 0,006	0,06 ± 0,03
	H ^{δ₂/δ₃}	3,6384 ± 0,0004	-0,074 ± 0,009	0,08 ± 0,04
Thr	(H ^γ) ₃	1,2117 ± 0,0001	-0,049 ± 0,002	0,02 ± 0,01
Trp	H ^{δ₁}	7,2641 ± 0,0004	0,015 ± 0,009	0,19 ± 0,05
	H ^{ε₁}	10,1972 ± 0,0004	-0,237 ± 0,009	0,63 ± 0,05
	H ^{ε₃}	7,6417 ± 0,0004	-0,113 ± 0,010	0,08 ± 0,05
	H ^{ζ₂}	7,4981 ± 0,0002	0,003 ± 0,006	0,08 ± 0,03
	H ^{ζ₃}	7,1710 ± 0,0006	-0,047 ± 0,014	0,12 ± 0,07
	H ^{η₂}	7,2472 ± 0,0008	-0,030 ± 0,018	0,14 ± 0,09
Tyr	H ^{δ₁/δ₂}	7,1385 ± 0,0003	-0,058 ± 0,007	0,09 ± 0,03
	H ^{ε₁/ε₂}	6,8480 ± 0,0002	-0,023 ± 0,005	0,10 ± 0,03
Val	(H ^{γ₁/γ₂}) ₃	0,9445 ± 0,0001	-0,067 ± 0,002	0,04 ± 0,01
		0,9313 ± 0,0001	-0,068 ± 0,003	0,04 ± 0,01
Mittel ^d H ^C		3,9022 (2,7544)	-0,058 (0,062)	0,06 (0,12)
H ^N		7,5225 (1,0165)	0,024 (0,261)	0,07 (0,26)

Tabelle 4.5: Druckabhängigkeit der Seitenketten chemischen Verschiebungen von Protonen. Probenzusammensetzung und Bedingungen der Messungen wie in Tabelle 4.2. δ_0 , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung aus Gleichung 2.12. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. ^aStereospezifische Zuordnung nach [Har13]; ^bMessung durchgeführt bei pH 4,0; ^cMessung durchgeführt bei pH 8,5; ^dMittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern, getrennt nach kohlenstoff- und stickstoffgebundenen Protonen.

den kohlenstoffgebundenen Protonen einen Mittelwert von 0,06 ppm GPa⁻² mit einer Standardabweichung von 0,12 ppm GPa⁻². Die stereospezifisch nicht zugeordnete Resonanz von Leu H^{γ₁₂/γ₁₃} wies mit 0,57 ± 0,12 ppm GPa⁻² das am stärksten positive B_2^{HC} der Seitenketten auf, His H^{δ₂} bei pH 8,5 das am stärksten negative (-0,23 ± 0,28 ppm GPa⁻²). Ein B_1 und B_2 gleichen Vorzeichens konnte bei Gln H^{γ₂} und Gln H^{γ₃} sowie jeweils bei einer der beiden Resonanzen von Ile H^{γ₁₂/γ₁₃} und Met H^{γ₁₂/γ₁₃} gefunden werden. Desweiteren war dies ebenso bei His H^{δ₂} (pH 4,0), His H^{ε₁} (pH 8,5), Pro_{cis} H^{δ₂/δ₃} sowie Trp H^{ζ₂} der Fall (Tabelle 4.5).

4.2.1.5 ¹⁵N Protein Rückgrat

Die Untersuchungen der Druckabhängigkeit der ¹⁵N chemischen Verschiebungen des Rückgrates offenbarten einen Mittelwert bei 0,1 MPa von 120,893 ppm mit einer Standardabweichung von 5,337 ppm. Die Extrema der Streuung dieser Werte stellten einerseits

Pro_{cis} mit $135,033 \pm 0,001$ ppm und andererseits Gly mit $109,219 \pm 0,003$ ppm dar. Die Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1^N wiesen mit einem Durchschnitt von $2,91$ ppm GPa^{-1} und einer Standardabweichung von $0,50$ ppm GPa^{-1} bei allen Aminosäuren ein positives Vorzeichen auf. Somit verschoben sich alle Resonanzen mit steigendem Druck in Richtung Tieffeld (Abbildung 4.8). Die stärkste Druckabhängigkeit in erster Näherung war bei Gly mit $3,79 \pm 0,08$ ppm GPa^{-1} messbar, die geringste druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung konnte bei Pro_{cis} mit $1,36 \pm 0,02$ ppm GPa^{-1} registriert werden. Der Mittelwert der Krümmung dieser Verschiebung der Resonanzfrequenz ergab sich zu $-2,33$ ppm GPa^{-2} , wobei die Standardabweichung $0,85$ ppm GPa^{-2} betrug. Die konstant negativen Vorzeichen der B_2^N aller Aminosäuren führten in Verbindung mit den positiven B_1^N insgesamt zu einem sättigenden Verlauf der Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen.

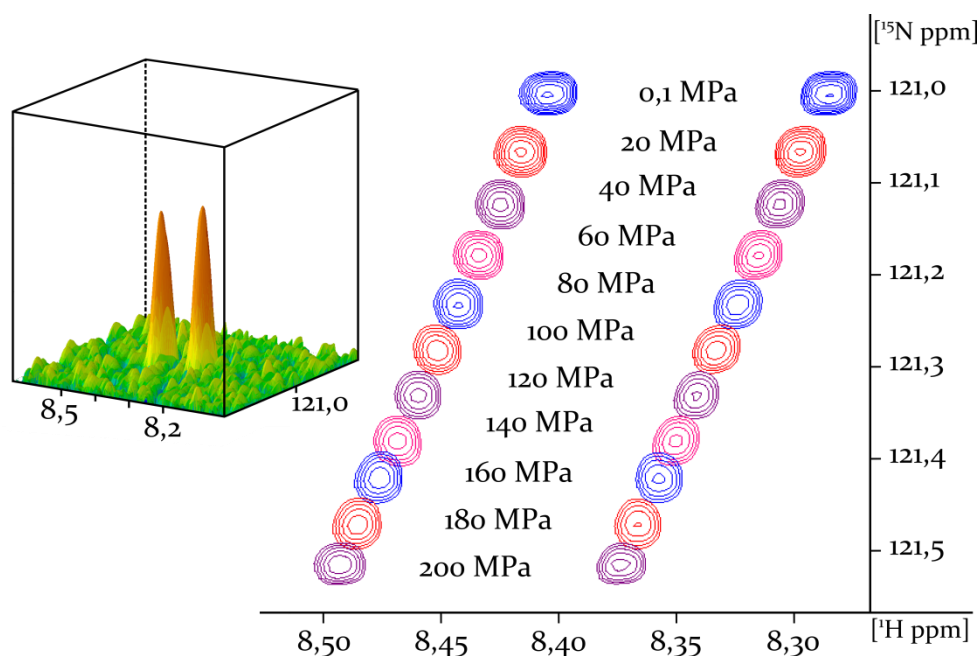


Abbildung 4.8: Druckabhängige ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren der Rückgrat Amid-Region von Arginin. Alle Parameter aus Gleichung 2.12, welche die Druckabhängigkeit beschreiben, weisen bei Arginin einen durchschnittlichen Wert auf (Tabellen 4.2 und 4.5). Die sinkenden Signalintensitäten zu höheren Drücken hin sind auf den verstärkten chemischen Austausch der Amidprotonen zurückzuführen, welcher ebenfalls eine geringere Polarisation der ^{15}N -Kerne zur Folge hat. Kleiner Kasten: dreidimensionale Darstellung der Resonanz bei 0,1 MPa. Die Probe enthielt 5 mM Ac-Gly-Gly-Arg-Ala- NH_2 mit 20 mM Tris-HCl und 0,5 mM DSS in 10 % D_2O / 90 % H_2O bei pH 6,7. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 283 K und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz durchgeführt. Die Daten wurden mit einem Gauss-Filter mit einer negativen Linienverbreiterung von -10 Hz (^{15}N) und -5 Hz (^1H) prozessiert.

Xxx	δ_o^N [ppm]	B_1^N [ppm GPa ⁻¹]	B_2^N [ppm GPa ⁻²]
Ala	124.387 ± 0.001	2.74 ± 0.03	-1.49 ± 0.16
Arg	121.005 ± 0.002	3.01 ± 0.04	-2.44 ± 0.21
Asn	119.112 ± 0.010	2.98 ± 0.17	-1.73 ± 0.82
Asp	120.937 ± 0.003	2.94 ± 0.07	-2.58 ± 0.36
Cys	119.211 ± 0.004	2.75 ± 0.08	-1.87 ± 0.41
Gln	120.243 ± 0.003	2.87 ± 0.06	-2.15 ± 0.29
Glu	120.939 ± 0.007	2.78 ± 0.17	-1.66 ± 0.83
Gly	109.219 ± 0.003	3.79 ± 0.08	-2.16 ± 0.37
His ^a	118.334 ± 0.003	3.42 ± 0.08	-2.86 ± 0.38
His ^b	120.327 ± 0.004	3.15 ± 0.10	-3.53 ± 0.50
Ile	120.393 ± 0.004	2.35 ± 0.03	-1.89 ± 0.17
Leu	122.063 ± 0.004	2.65 ± 0.10	-2.92 ± 0.48
Lys	121.288 ± 0.001	3.00 ± 0.03	-2.24 ± 0.13
Met	120.174 ± 0.002	2.76 ± 0.05	-1.89 ± 0.22
Phe	120.621 ± 0.002	3.01 ± 0.04	-3.65 ± 0.19
Pro _{trans}	134.783 ± 0.001	2.45 ± 0.02	-1.76 ± 0.10
Pro _{cis}	135.033 ± 0.001	1.36 ± 0.02	-0.38 ± 0.10
Ser	116.277 ± 0.006	3.41 ± 0.15	-2.46 ± 0.70
Thr	114.138 ± 0.002	3.28 ± 0.05	-2.36 ± 0.24
Trp	121.424 ± 0.001	3.35 ± 0.03	-2.90 ± 0.17
Tyr	120.333 ± 0.003	3.56 ± 0.07	-4.52 ± 0.32
Val	119.410 ± 0.001	2.32 ± 0.02	-1.70 ± 0.12
Mittel ^c	120,893 (5,337)	2,91 (0,50)	-2,33 (0,85)

Tabelle 4.6: Druckabhängigkeit der Rückgrat ¹⁵N chemischen Verschiebungen. Die Proben enthielten 5 mM Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ mit 20 mM Tris-HCl und 0,5 mM DSS in 10 % D₂O / 90 % H₂O bei pH 6,7. Die HSQC-Messungen wurden bei einer Temperatur von 283 K und Drücken von 0,1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa durchgeführt. δ_o , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung aus Gleichung 2.12. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf ein Konfidenzintervall von 95 %. ^aMessung durchgeführt bei pH 4,0; ^bMessung durchgeführt bei pH 8,5; ^cMittelwerte mit Standardabweichungen σ in Klammern.

Ein gänzlich analoger Effekt wurde bei den Amidprotonen entdeckt (Abschnitt 4.2.1.2). Die geringste Rechtskrümmung zeigte sich bei Pro_{cis} mit $-0,38 \pm 0,10$ ppm GPa⁻², die stärkste bei Tyr mit $-4,52 \pm 0,32$ ppm GPa⁻² (Abbildung 4.9).

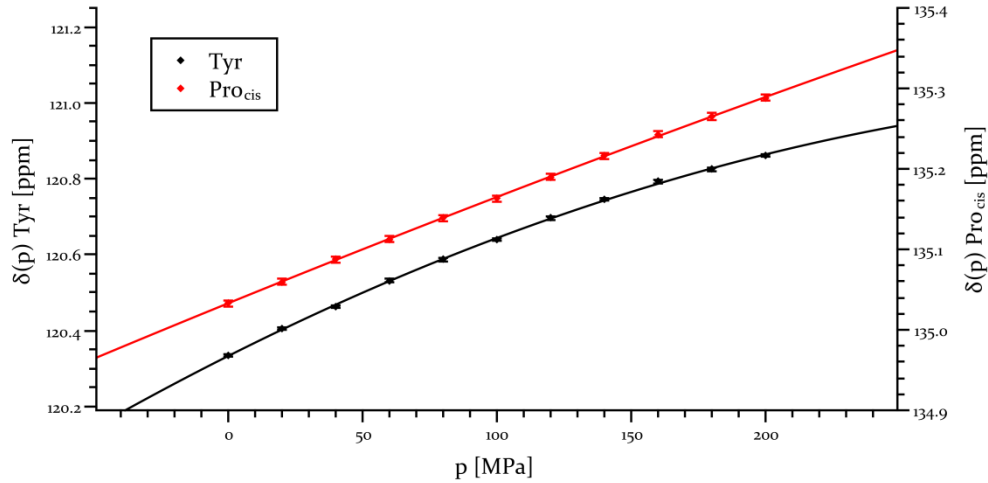


Abbildung 4.9: Nichtlinearität der Druckabhängigkeit der ^{15}N chemischen Verschiebungen. Druckabhängige chemische Verschiebung von Prolin in cis-Konformation (rot) und Tyrosin (schwarz). Die Probenzusammensetzung sowie die Messungen waren analog zu Tabelle 4.6. Angegebene Fehler entsprechen der digitalen Auflösung des 2D-HSQC-Experimentes. Durchgezogene Linien: Fit der Daten mit Gleichung 2.12 unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 4.6 mit einem jeweiligen Determinationskoeffizienten von $R^2 > 0,99$.

4.2.1.6 ^{15}N der Seitenketten

Aufgrund der strukturellen Unterschiede der Seitenketten zeigten die chemischen Verschiebungen der ^{15}N -Kerne bei einem Druck von 0,1 MPa einen Mittelwert (107,114 ppm) mit einer großen Standardabweichung von 45,101 ppm. Die Resonanz von Lys N^ζ war mit $32,614 \pm 0,013$ ppm am weitesten in Richtung Hochfeld verschoben (Abbildung 4.10), His $\text{N}^{\delta 1}$ mit $175,8444 \pm 0,0002$ ppm, gefolgt von His $\text{N}^{\epsilon 1}$ mit $173,137 \pm 0,003$ ppm, am weitesten in Richtung Tieffeld (Tabelle 4.7). Beide Resonanzen wurden nur im vollständig protonierten Imidazolring bei pH 4,0 mittels einer HCN-Pulssequenz gemessen (Abbildung 4.11) und nach [Sud96] zugeordnet. Bei pH 8,5 ließ sich im vollständig deprotonierten Zustand kein Polarisationstransfer bewerkstelligen.

Die Druckkoeffizienten erster Ordnung offenbarten einen Durchschnittswert von $4,01 \text{ ppm GPa}^{-1}$, die Standardabweichung betrug hierbei $2,48 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Alle B_1^{N} wiesen ein positives Vorzeichen auf, wobei bei Asn N^δ ($7,65 \pm 0,20 \text{ ppm GPa}^{-1}$) die größte und bei His $\text{N}^{\delta 1}$ ($0,216 \pm 0,005 \text{ ppm GPa}^{-1}$) die geringste Druckabhängigkeit in erster Näherung zu verzeichnen war. Bei den Druckkoeffizienten zweiter Ordnung B_2^{N} ergab sich ein Mittelwert von $-4,00 \text{ ppm GPa}^{-2}$ mit einer Standardabweichung von $2,51 \text{ ppm GPa}^{-2}$. Alle Werte besaßen ein negatives Vorzeichen. Die beiden stereospezifisch nicht zugeordneten Resonanzen $\text{N}^{\eta 1/\eta 1}$ der Guanidinogruppe von Arg erwiesen sich mit $-8,83 \pm 0,91$ / $-6,03 \pm 0,88 \text{ ppm GPa}^{-2}$ als am stärksten rechtsgekrümmt. His $\text{N}^{\delta 1}$ dagegen hatte mit $-0,19 \pm 0,02 \text{ ppm GPa}^{-2}$ ein nahezu lineares Druckverhalten (Tabelle 4.7).

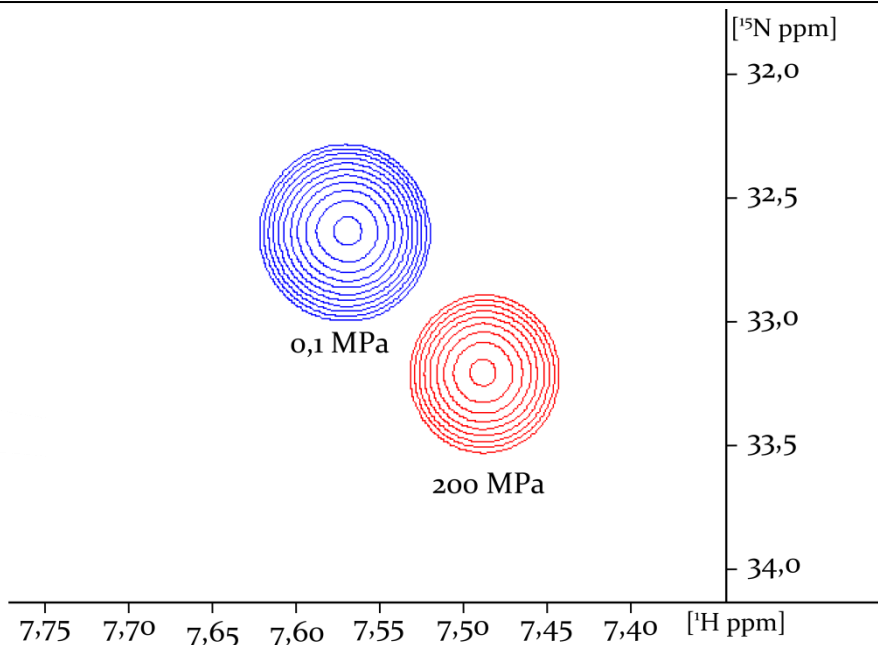


Abbildung 4.10: **Protonenentkoppeltes HSQC-Spektrum der Resonanz von Lys N^{ϵ} .** Chemische Verschiebung gezeigt bei 0,1 MPa (blau) und 200 MPa (rot). Die Probe enthielt 5 mM Ac-Gly-Gly-Lys-Ala- NH_2 mit 20 mM Tris-HCl und 0,5 mM DSS in 10 % D_2O / 90 % H_2O bei pH 6,7. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 283 K und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz durchgeführt. Die Daten wurden mit einem Gauss-Filter mit einer negativen Linienverbreiterung von -5 Hz (1H) und -10 Hz (^{15}N) prozessiert.

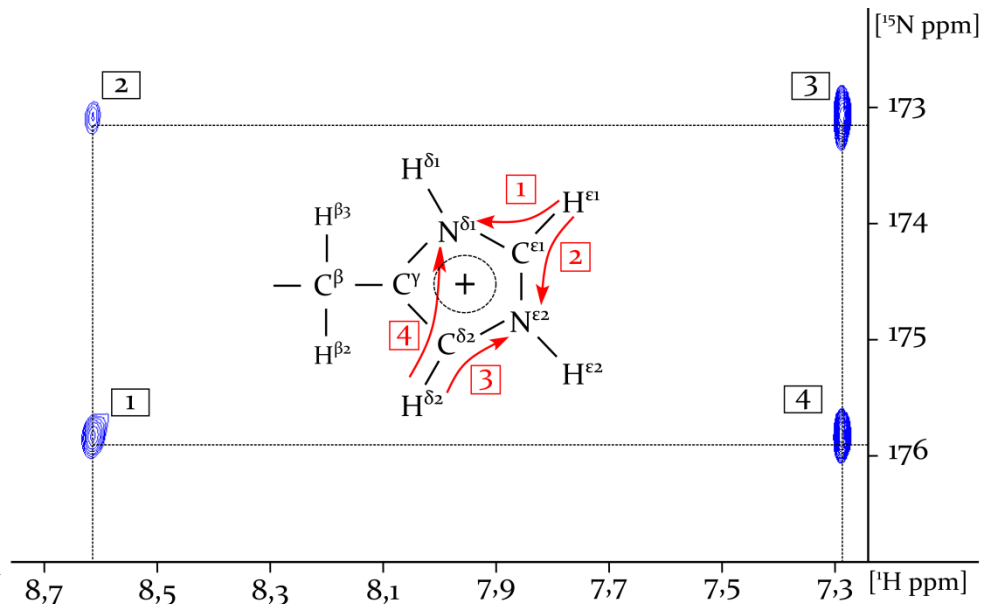


Abbildung 4.11: **HCN-Polarisationstransfer bei Histidin.** Der Polarisationstransfer im vollständig protonierten Imidazolring erfolgte von $H^{\epsilon 1}$ über $C^{\epsilon 1}$ zu $N^{\epsilon 2}$ beziehungsweise $N^{\delta 1}$ (linke Spalte) sowie von $H^{\delta 2}$ über $C^{\delta 2}$ zu $N^{\epsilon 2}$ beziehungsweise $N^{\delta 1}$ (rechte Spalte). Die Probe enthielt 5 mM Ac-Gly-Gly-His-Ala- NH_2 mit 20 mM Tris-HCl und 0,5 mM DSS in 10 % D_2O / 90 % H_2O bei pH 4,0; $T=238$ K und $p=0,1$ MPa. Das Spektrum wurde mit einem Gauss-Filter mit einer negativen Linienverbreiterung von -15Hz (^{15}N) und -10Hz (1H) prozessiert.

Xxx		δ_o [ppm]	B_1 [ppm GPa ⁻¹]	B_2 [ppm GPa ⁻²]
Arg	N ^ε	84,344 ± 0,007	1,77 ± 0,27	-4,0 ± 2,1
	N ^{η¹/η¹}	72,255 ± 0,008	5,57 ± 0,19	-8,83 ± 0,91
		70,143 ± 0,008	5,38 ± 0,18	-6,03 ± 0,88
Asn	N ^δ	113,245 ± 0,009	7,65 ± 0,20	-3,19 ± 0,95
Gln	N ^ε	112,929 ± 0,006	7,51 ± 0,14	-5,68 ± 0,68
His ^a	N ^{ε2}	173,137 ± 0,003	2,08 ± 0,06	-4,69 ± 0,28
	N ^{δ1}	175,8444 ± 0,0002	0,216 ± 0,005	-0,19 ± 0,02
Lys	N ^ζ	32,614 ± 0,013	3,04 ± 0,32	-2,0 ± 1,5
Trp	N ^ε	129,510 ± 0,004	2,84 ± 0,08	-1,40 ± 0,34
Mittel ^b		107,114 (45,101)	4,01 (2,48)	-4,00 (2,51)

Tabelle 4.7: Druckabhängigkeit der Seitenketten ¹⁵N chemischen Verschiebungen. δ_o , B_1 und B_2 sind die Koeffizienten nullter, erster und zweiter Ordnung aus Gleichung 2.13 bei pH 6,7 und 283 K. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. Probenzusammensetzung und Messbedingungen wie in Tabelle 4.6. ^aHCN-Experiment durchgeführt bei pH 4,0, Resonanzen zugeordnet nach [Sud96]; ^bMittelwerte mit Standardabweichungen σ in Klammern.

4.2.1.7 Sequenzabhängigkeit der chemischen Verschiebung

Da in den 1D Experimenten alle Protonenresonanzen in den gestreckten Tetrapeptiden Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ gemessen wurden, war es möglich, den Einfluss eines beliebigen Aminosäurerestes auf seine Umgebung in der Peptidkette zu untersuchen. Die druckabhängigen chemischen Verschiebungen der Protonen in Gly₁, Gly₂ und Ala₄ wurden ebenso mit Gleichung 2.12 gefittet. Die Druckkoeffizienten nullter (Tabelle 9.1), erster (Tabelle 9.2) und zweiter Ordnung (Tabelle 9.3) der Referenz Ac-Gly-Gly-Gly-Ala-NH₂ wurden sodann von den Ergebnissen der anderen Peptide (ebenda) subtrahiert. Die dabei entstehende Differenz war einzig auf die Seitenkette der Aminosäure an Position 3 zurückzuführen und nicht mehr auf die bloße Position innerhalb des Peptids. Die hier angegebenen druckabhängigen Korrekturfaktoren spiegeln nur Nachbarschaftseffekte wieder, sind also sequenzabhängig. Der mittlere Korrekturfaktor $K(\delta_o)$ des Druckkoeffizient nullter Ordnung δ_o ergab mit Ausnahme von Ala₄^{HN} stets eine Verschiebung in Richtung Hochfeld. Den geringsten mittleren Einfluss einer komplexen Seitenkette zeigte die Methylgruppe von Ala₄, gefolgt von den H^α-Protonen. Bei den Amidprotonen ließ sich bereits an den Mittelwerten die Nähe von Gly₂ und Ala₄ zur Aminosäure an der 3. Position ausmachen. Wobei sich Gly₂^{HN} durchschnittlich um -0,08 ppm und Ala₄^{HN} um 0,09 ppm verschob. Relativ großen Einfluss auf die chemischen Verschiebungen der Nachbarn ließen sich bei Trp und Tyr nachweisen (Tabelle 4.8).

Der Korrekturfaktor $K(B_1)$ des Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1 aus Gleichung 2.12 zeigte für manche Aminosäurereste einen starken Einfluss auf die Amidprotonen. Interessanterweise war hier der Einfluss auf Gly₁ (0,04 ppm GPa⁻¹) im Mittel stärker als auf Gly₂

Xxx	$K(\delta_o^{HN})$			$K(\delta_o^{H\alpha})$			$K(\delta_o^{H\beta})$
	Gly1 [ppm]	Gly2 [ppm]	Ala4 [ppm]	Gly1 [ppm]	Gly2 [ppm]	Ala4 [ppm]	Ala4 [ppm]
Ala	-0,01	-0,08	0,02	-0,02	-0,03	-0,03	0,00
Arg	0,00	-0,05	0,12	-0,02	-0,02	-0,02	0,00
Asn	-0,02	-0,06	0,08	-0,01	-0,03	-0,02	0,00
Asp	-0,02	-0,08	0,05	-0,01	-0,02	-0,03	0,01
Cys	0,05	-0,11	0,21	0,03	-0,03	0,00	0,01
Gln	-0,01	-0,04	0,14	-0,01	-0,02	-0,02	0,00
Glu	0,04	-0,05	0,12	0,00	-0,02	-0,03	0,00
Gly ^a	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
His ^b	-0,02	-0,09	0,16	-0,05	-0,05	0,01	-0,01
Ile	-0,07	-0,12	0,16	-0,02	-0,02	-0,01	0,00
Leu	-0,01	-0,07	0,03	-0,03	-0,04	-0,03	0,00
Lys	0,00	-0,06	0,10	-0,02	-0,04	-0,02	0,00
Met	-0,01	-0,05	0,08	-0,02	-0,03	-0,01	0,00
Phe	-0,04	-0,08	0,06	-0,09	-0,07	-0,06	-0,07
Pro	-0,11	-0,14	0,17	-0,01	-0,02	-0,02	0,00
Ser	-0,01	-0,04	0,12	-0,01	0,02	0,02	0,01
Thr	-0,01	-0,04	0,11	-0,01	0,04	0,01	0,01
Trp	-0,12	-0,17	-0,18	-0,10	-0,10	-0,15	-0,21
Tyr	-0,15	-0,07	0,06	-0,13	-0,14	-0,06	-0,07
Val	-0,09	-0,19	0,20	-0,03	-0,04	-0,02	0,00
Mittel	-0,03	-0,08	0,09	-0,03	-0,03	-0,03	-0,01

Tabelle 4.8: **Sequenzabhängige Korrekturfaktoren $K(\delta_o)$.** Auf das Peptid Ac-Gly-Gly-Gly-Ala-NH₂ bezogene Korrekturfaktoren $K(\delta_o)$ zur Sequenzabhängigkeit des Druckkoeffizienten nullter Ordnung δ_o aus Gleichung 2.12. Berechnet aus den Werten von Tabelle 9.1. ^aReferenzwert; ^bWerte gemessen bei pH 4,0.

(0,01 ppm GPa⁻¹). Pro erhöhte die Druckabhängigkeit von Gly1 um 0,25 ppm GPa⁻¹, Asp diejenige von Gly2 um 0,21 ppm GPa⁻¹. Eine signifikante Reduktion war bei Gly2, sowohl durch Tyr als auch durch Val jeweils um -0,13 ppm GPa⁻¹ verursacht, auszumachen. Bei den H^α- und H^β-Protonen zeigte einzig Trp (-0,14 ppm GPa⁻¹ und -0,12 ppm GPa⁻¹) einen merklichen, verstärkenden Einfluss auf die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung von Ala4 (Tabelle 4.9).

Xxx	$K(B_1^{HN})$			$K(B_1^{H\alpha})$			$K(B_1^{H\beta})$
	Gly1 [ppm GPa ⁻¹]	Gly2 [ppm GPa ⁻¹]	Ala4 [ppm GPa ⁻¹]	Gly1 [ppm GPa ⁻¹]	Gly2 [ppm GPa ⁻¹]	Ala4 [ppm GPa ⁻¹]	Ala4 [ppm GPa ⁻¹]
Ala	0,02	0,08	0,07	0,01	-0,01	-0,02	0,00
Arg	0,00	0,04	0,01	-0,01	-0,05	-0,03	-0,01
Asn	-0,01	0,01	0,05	-0,02	-0,02	0,01	-0,02
Asp	0,03	0,21	0,06	-0,03	-0,05	0,01	-0,01
Cys	0,11	-0,08	0,02	-0,01	-0,01	0,01	0,00
Gln	0,01	-0,02	-0,04	0,00	-0,02	-0,05	0,00
Glu	0,15	0,04	0,11	-0,01	-0,02	-0,03	-0,01
Gly ^a	(o)	(o)	(o)	(o)	(o)	(o)	(o)
His ^b	0,01	0,04	0,00	-0,01	0,00	-0,03	-0,02
Ile	0,05	-0,04	0,14	0,00	-0,04	-0,04	0,01
Leu	0,03	0,10	0,18	0,01	-0,02	-0,03	-0,01
Lys	0,05	0,09	0,12	0,01	0,02	-0,02	0,00
Met	0,01	0,07	0,14	0,00	0,00	-0,03	0,00
Phe	0,02	-0,09	0,10	-0,02	-0,02	-0,04	-0,01
Pro	0,25	-0,06	0,13	0,00	-0,01	-0,03	0,01
Ser	0,04	0,02	-0,02	0,00	0,00	-0,01	-0,01
Thr	0,00	-0,02	0,09	0,00	-0,01	-0,03	0,00
Trp	0,09	0,03	0,16	0,04	-0,03	-0,14	-0,12
Tyr	-0,02	-0,13	0,16	-0,01	-0,03	-0,04	-0,01
Val	-0,02	-0,13	0,08	-0,01	-0,01	-0,05	0,01
Mittel	0,04	0,01	0,08	0,00	-0,02	-0,03	-0,01

Tabelle 4.8: **Sequenzabhängige Korrekturfaktoren $K(B_1)$.** Auf das Peptid Ac-Gly-Gly-Gly-Ala-NH₂ bezogene Korrekturfaktoren $K(B_1)$ zur Sequenzabhängigkeit des Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1 aus Gleichung 2.12. Berechnet aus den Werten von Tabelle 9.2. ^a Referenzwert; ^b Werte gemessen bei pH 4,0.

Der Einfluss auf das Krümmungsverhalten der H^α- und H^β-Protonen erwies sich als geringfügig um den Nullpunkt schwankend. Somit ergab sich hier keine signifikante Änderung. Die Amidprotonen dagegen zeigten tendenziell eine stärker rechtsgekrümmte Druckabhängigkeit, als dies beim Referenzpeptid Ac-Gly-Gly-Gly-Ala-NH₂ der Fall war. Speziell bei Ala4 intensivierte sich der asymptotische Charakter der Druckabhängigkeit (Tabelle 9.3) deutlich unter dem Einfluss der Aminosäurereste Glu (-0,27 ppm GPa⁻²), Pro (-0,21 ppm GPa⁻²), Thr (-0,24 ppm GPa⁻²), Trp (-0,25 ppm GPa⁻²) und Tyr (-0,24 ppm GPa⁻²). Nahezu li-

Xxx	K(B ₂ ^{HN})			K(B ₂ ^{Hα})			K(B ₂ ^{Hβ})
	Gly1 [ppm GPa ⁻²]	Gly2 [ppm GPa ⁻²]	Ala4 [ppm GPa ⁻²]	Gly1 [ppm GPa ⁻²]	Gly2 [ppm GPa ⁻²]	Ala4 [ppm GPa ⁻²]	Ala4 [ppm GPa ⁻²]
Ala	0,02	-0,19	-0,11	0,01	-0,02	0,05	-0,01
Arg	0,01	0,04	0,12	0,05	0,10	0,02	0,02
Asn	0,02	-0,09	-0,02	0,12	0,01	-0,08	0,03
Asp	0,01	0,34	-0,19	0,06	0,12	0,00	0,01
Cys	-0,02	0,00	-0,12	-0,01	-0,01	-0,09	-0,01
Gln	-0,02	0,17	0,32	0,01	-0,02	0,08	-0,01
Glu	-0,15	-0,08	-0,27	0,01	-0,01	0,02	0,00
Gly ^a	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
His ^b	-0,03	-0,08	-0,12	0,00	-0,04	0,03	0,01
Ile	-0,36	-0,09	-0,07	0,02	0,13	0,01	-0,03
Leu	-0,05	-0,15	-0,13	-0,02	0,00	0,02	0,02
Lys	-0,18	-0,36	-0,03	0,00	-0,07	0,07	-0,01
Met	0,01	-0,13	-0,17	0,01	0,03	0,06	-0,01
Phe	0,07	-0,25	0,01	-0,01	-0,01	0,14	0,03
Pro	-0,41	-0,06	-0,21	-0,01	-0,01	0,06	-0,02
Ser	-0,22	-0,11	-0,03	-0,01	0,00	0,03	-0,01
Thr	-0,03	0,11	-0,24	0,00	-0,03	0,02	0,00
Trp	-0,08	-0,07	-0,25	-0,09	-0,03	0,06	-0,05
Tyr	0,26	-0,21	-0,24	0,04	0,01	0,07	0,03
Val	0,13	0,21	0,05	0,04	-0,03	0,05	0,00
Mittel	-0,05	-0,05	-0,09	0,01	0,01	0,03	0,00

Tabelle 4.9: **Sequenzabhängige Korrekturfaktoren K(B₂).** Auf das Peptid Ac-Gly-Gly-Gly-Ala-NH₂ bezogene Korrekturfaktoren K(B₂) zur Sequenzabhängigkeit des Druckkoeffizienten zweiter Ordnung B₂ aus Gleichung 2.13. Berechnet aus den Werten von Tabelle 9.2.
^a Referenzwert; ^b Werte gemessen bei pH 4,0.

nearisiert wurde die Druckabhängigkeit von Ala4 H^N durch Gln (0,32 ppm GPa⁻²). Bei Gly2 entstand dagegen aus einem anfangs nahezu linearen Verlauf der chemischen Verschiebung mit dem Druck eine starke Krümmung in beide Richtungen: hier hatten Asp (0,34 ppm GPa⁻²) und Lys (-0,36 ppm GPa⁻²) den größten Einfluss. Die stärkste Änderung des Krümmungsverhaltens machte sich bei Gly1 bemerkbar, vermittelt durch Pro (-0,41 ppm GPa⁻²) (Tabelle 4.10).

4.2.2 $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen

Die Bestimmung der Druckabhängigkeit der $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen aller 20 Standardamino­säuren erfolgte durch die Subtraktion der aufgespal­tenen Resonanzfrequenzen in der direkten Dimension der 1H - ^{15}N -HSQC-Experimente (Ab­bildung 4.8). Da diese Aufspaltung prinzipiell von weiteren H-H-Kopplungen beeinflusst sein könnte, wäre die Analyse der Aufspaltung in indirekter Dimension die verlässlichere

Xxx	$^1J_{N-H}$ bei 0,1 MPa [Hz]	$^1J_{N-H}$ bei 200 MPa [Hz]	Δ^1J_{N-H} [Hz]
Ala	-95.1	-97.1	-1.9
Arg	-95.1	-95.1	-0.1
Asn	-96.3	-98.9	-2.6
Asp	-95.5	-96.7	-1.3
Cys	-94.9	-98.5	-3.6
Gln	-93.5	-96.6	-3.1
Glu	-94.2	-93.9	0.3
Gly	-96.3	-97.3	-1.0
His ^b	-94.2	-93.7	0.5
Ile	-92.9	-94.8	-1.9
Leu	-94.0	-94.1	-0.2
Lys	-94.7	-97.3	-2.6
Met	-93.1	-94.0	-0.9
Phe	-95.1	-94.7	0.5
Ser	-95.5	-93.4	2.1
Thr	-93.8	-96.3	-2.5
Trp	-94.5	-95.0	-0.5
Tyr	-93.9	-92.8	1.1
Val	-93.1	-92.7	0.4
Mittel ^c	-94,5 (1,0)	-95,4 (1,8)	-0,9 (1,5)

Tabelle 4.11: $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen. Daten gezeigt bei atmosphärischen 0,1 MPa und bei 200 MPa sowie ihre Differenz. Die Proben enthielten 5 mM Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ mit 20 mM Tris-HCl und 0,5 mM DSS in 10 % D₂O / 90 % H₂O bei pH 6,7. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 283 K und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz durchgeführt. Die $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten ergeben sich aus der Differenz der Resonanzfrequenzen in der direkten Dimension des HSQC-Experimentes. Somit können die Fehler entsprechend der doppelten digitalen Auflösung des Experimentes mit 0,2 Hz angegeben werden. ^bMessung bei pH 4,0; ^cMittelwert mit Standardabweichung σ in Klammern.

Alternative. Aufgrund der Entkopplung der Spektren in der ^{15}N Dimension, welche für ein adäquates Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Analyse der chemischen Verschiebung von Nöten war, blieb nur die hier verwendete Methode zur Bestimmung der $^1J_{\text{N-H}}$ -Kopplungskonstanten. Der Mittelwert betrug bei 0,1 MPa -94,5 Hz mit einer Standardabweichung von 1,0 Hz und bei 200 MPa -95,4 Hz mit einer Standardabweichung von 1,8 Hz. Somit verschob sich die durchschnittliche Kopplungskonstante aller Amidgruppen um -0,9 Hz hin zu stärker negativen Werten. Die Standardabweichung von 1,5 Hz offenbarte aber bereits, dass die Änderungen aller Aminosäuren nicht das selbe Vorzeichen haben konnten. Wies Ile mit $-92,9 \pm 0,2$ Hz den betraglich kleinsten Wert bei 0,1 MPa auf, so war dies bei 200 MPa Val mit $-92,7 \pm 0,2$ Hz. Die am stärksten negative Kopplungskonstante war bei atmosphärischem Druck bei Gly und Asn mit jeweils $-96,3 \pm 0,2$ Hz messbar, bei Hochdruck mit $-98,9 \pm 0,2$ Hz nur noch bei Asn. Die größte Änderung hin zu negativeren Werten wurde bei Cys mit $-3,6 \pm 0,4$ Hz registriert. In die andere Richtung, hin zu betraglich kleineren Konstanten, stellte Ser mit $2,1 \pm 0,4$ Hz das Extremum dar. Als unabhängig vom Druck erwies sich die Kopplungskonstante von Arg mit einer Änderung von $-0,1 \pm 0,4$ Hz (Tabelle 4.11).

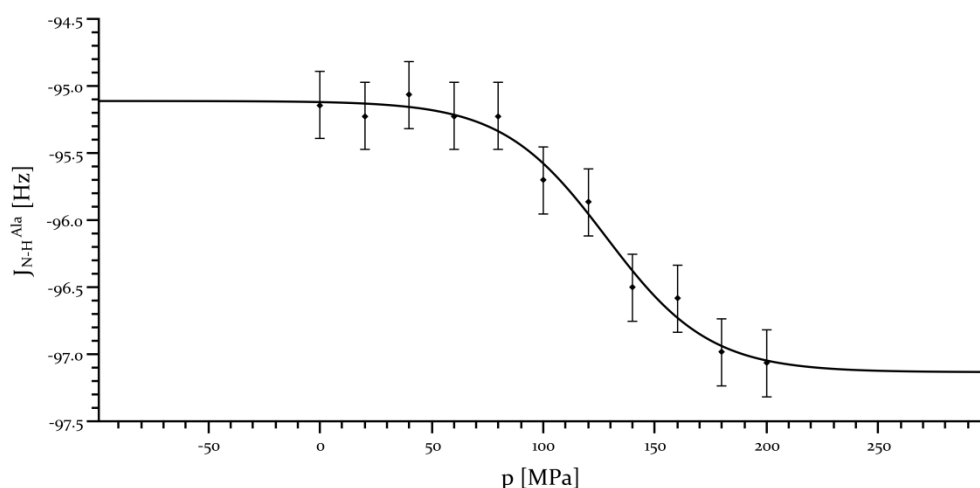


Abbildung 4.12: **Druckabhängigkeit von $^1J_{\text{N-H}}$ in Alanin.** Daten erhoben in Ala3 aus Ac-Gly-Gly-Ala-Ala-NH₂ bei pH 6,7, einer Temperatur von 283 K und einer Resonanzfrequenz von 800 MHz. Zustände 1 (links) und 2 (rechts) befinden sich beide innerhalb des untersuchten Druckbereichs. Probenzusammensetzung wie in Tabelle 4.11. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die digitale Auflösung des Experimentes. Durchgezogene Linie: Fit der Daten mit Gleichung 2.15 unter Verwendung von Parametern aus Tabelle 4.12. Der erreichte Determinationskoeffizient R^2 ist 0,98.

Der Verlauf der $^1J_{\text{N-H}}$ -Kopplungskonstanten (Abbildung 4.12) innerhalb des untersuchten Druckbereichs ließ, bis auf wenige Ausnahmen, eine thermodynamische Analyse zu. Lediglich das bereits erwähnte Arg erwies sich als unabhängig vom Druck. Desweiteren scheiterte die Bestimmung thermodynamischer Parameter bei Val aufgrund einer nur linearen Änderung der Konstanten mit dem Druck. Von den verbleibenden 18 Aminosäuren konnten 16 mittels Gleichung 2.15 sigmoidal gefittet werden. In diesem Zweizustandsmodell, war J_1 mit Zustand 1 bei niedrigem Druck, und J_2 mit Zustand 2 bei Hochdruck zu assoziieren (Tabelle 4.12). Diese Zustände ergaben sich aus dem mathematischen Modell heraus und mussten somit nicht exakt mit der Situation bei 0,1 MPa sowie 200 MPa übereinstimmen (Abbildung

Xxx	J ₁ [Hz]	J ₂ [Hz]	ΔG°_{12} [kJ mol ⁻¹]	ΔV°_{12} [ml mol ⁻¹]
Ala	-95.11 ± 0.04	-97.13 ± 0.06	13.0 ± 1.4	-101 ± 10
Arg ^a	-94.91 ± 0.09	-94.97 ± 0.09		
Asn	-96.05 ± 0.07	-99.00 ± 0.07	12.4 ± 1.4	-121 ± 14
Asp	-95.42 ± 0.04	-98.45 ± 0.17	11.1 ± 0.9	-53 ± 5
Cys ^b	-93.36 ± 0.08 [-82.53 ± 0.60]	-98.58 ± 0.04 [-98.66 ± 0.08]	2.2 ± 0.1 [-2.6 ± 0.1]	-52 ± 2 [-34 ± 2]
Gln ^b	-84.57 ± 0.73 [-91.76 ± 2.25]	-96.97 ± 0.43 [-96.97 ± 0.43]	-2.0 ± 0.1 [1.7 ± 2.7]	-30 ± 2 [-42 ± 21]
Glu ^c	-94.10 ± 0.34	-93.98 ± 0.51 [-95.42 ± 5.64]	22.7 ± 7.5 [8.9 ± 6.5]	-245 ± 108 [(-16 ± 11)·10 ¹]
Gly	-96.33 ± 0.02	-97.27 ± 0.02	22.4 ± 2.4	-181 ± 19
His ^d	-94.235 ± 0.002	-93.659 ± 0.003	8.6 ± 0.1	-73 ± 1
Ile ^b	-79.66 ± 2.23 [-92.58 ± 0.31]	-95.07 ± 0.12 [-95.12 ± 0.12]	-4.0 ± 0.4 [3.6 ± 0.8]	-91 ± 25 [-166 ± 30]
Leu	-93.94 ± 0.01	-94.13 ± 0.01	25.6 ± 13.6	(-31 ± 17) · 10 ¹
Lys	-94.78 ± 0.03	-109.12 ± 0.50	19.3 ± 1.0	-79 ± 5
Met ^c	-92.76 ± 0.42	-93.97 ± 0.08 [-98.62 ± 9.94]	43.7 ± 11.6 [6.3 ± 2.1]	-273 ± 78 [-35 ± 27]
Phe	-95.15 ± 0.02	-94.62 ± 0.04	31.0 ± 7.6	-185 ± 45
Ser ^b	-95.79 ± 0.04 [-109.64 ± 0.99]	-93.41 ± 0.02 [-93.33 ± 0.07]	4.6 ± 0.2 [-4.2 ± 0.1]	-88 ± 4 [-37 ± 3]
Thr ^b	-88.62 ± 0.59 [-92.77 ± 0.17]	-96.09 ± 0.07 [-96.16 ± 0.05]	-1.8 ± 0.2 [1.8 ± 0.4]	-87 ± 11 [-111 ± 13]
Trp	-94.57 ± 0.04	-95.21 ± 0.14	9.9 ± 3.5	-51 ± 21
Tyr	-93.94 ± 0.07	-90.50 ± 0.39	9.7 ± 1.2	-40 ± 7
Val ^a	-92.87 ± 0.05	-92.60 ± 0.05		
Mittel ^e	-92.96 (4.14)	-96.13 (3.62)	12.8 (11.9)	-119 (82)

Tabelle 4.12: Thermodynamische Parameter der ¹J_{N-H}-Kopplungen. J₁, J₂, ΔG°_{12} und ΔV°_{12} sind Parameter der sigmoidalen Gleichung 2.15. Die Determinationskoeffizienten R² der Fits variieren von 0,61 (Trp) bis größer als 0,99 (Cys, His, Met und Ser); alle Fehlerangaben beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. Probenzusammensetzung analog zu Tabelle 4.11. Die HSQC-Messungen wurden bei pH 6,7 und einer Temperatur von 283 K sowie in einem Druckbereich von 0,1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa durchgeführt. ^aJ₁ und J₂ beziehen sich auf einen linearen Fit innerhalb des gemessenen Druckbereichs; ^bWerte in Klammern beziehen sich auf ein alternatives Fit-Minimum, da hier das Vorzeichen von ΔG°_{12} nicht definiert ist: Cys ($\chi^2=0,14$ [0,43]), Gln ($\chi^2=0,03$ [0,61]), Ile ($\chi^2=0,12$ [1,41]), Ser ($\chi^2=0,04$ [0,38]), Thr ($\chi^2=0,03$ [0,32]); ^cFit mittels eines Dreizustandsmodells aus Gleichung 2.17, Werte in eckigen Klammern beziehen sich auf den Übergang 1-3; ^dMessung bei pH 4,0; ^eMittelwert mit Standardabweichung σ in Klammern, alternative Fits nicht berücksichtigt.

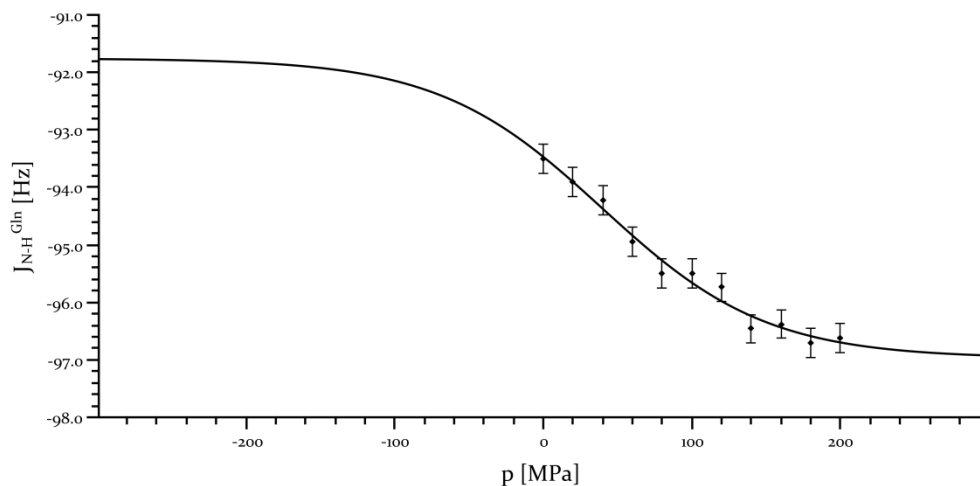


Abbildung 4.13: **Druckabhängigkeit von $^1J_{N-H}$ in Glutamin.** Daten erhoben in Gln₃ aus Ac-Gly-Gly-Gln-Ala-NH₂. Probenzusammensetzung wie in Tabelle 4.11. Gemessen bei einer Temperatur von 283 K und pH 6,7. Zustände 1 (links) und 2 (rechts) befinden sich nicht beide innerhalb des untersuchten Druckbereichs. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die digitale Auflösung des Experimentes. Durchgezogene Linie: Fit der Daten mit Gleichung 2.15 unter Verwendung von Parametern aus Tabelle 4.12. Der erreichte Determinationskoeffizient R^2 ist 0,98.

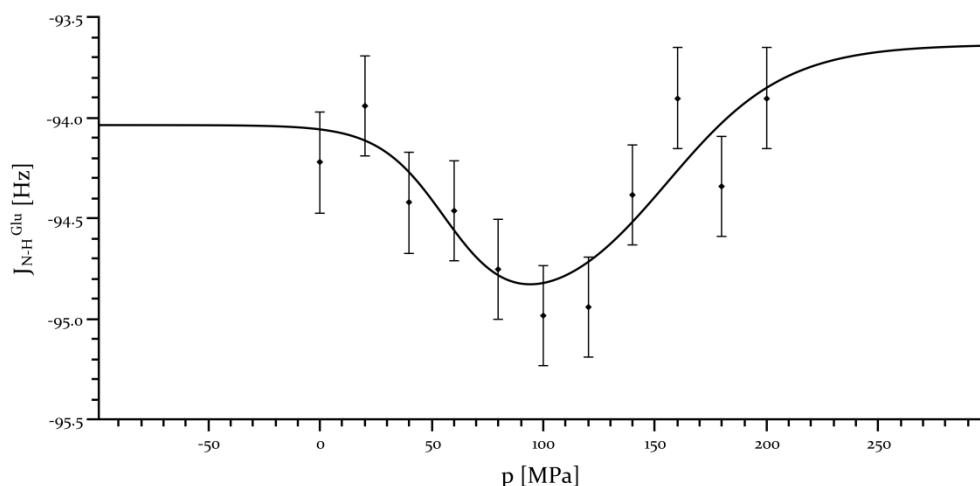


Abbildung 4.14: **Druckabhängigkeit von $^1J_{N-H}$ von Glutamat.** Daten erhoben in Glu₃ aus Ac-Gly-Gly-Glu-Ala-NH₂. Probenzusammensetzung wie in Tabelle 4.11. Gemessen bei einer Temperatur von 283 K und pH 6,7. Zustände 1 (links), 3 (Mitte) und 2 (rechts) befinden sich alle nahezu innerhalb des untersuchten Druckbereichs. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die digitale Auflösung des Experimentes. Durchgezogene Linie: Fit der Daten mit Gleichung 2.17 unter Verwendung von Parametern aus Tabelle 4.12. Der erreichte Determinationskoeffizient R^2 ist 0,72.

4.13). Glu (Abbildung 4.14) und Met offenbarten ein biphasisches Verhalten, weshalb hier ein Dreizustandsmodell, repräsentiert durch Gleichung 2.17, zugrunde gelegt wurde. Hier offenbarte sich innerhalb des Druckbereichs ein weiterer Zustand, vertreten durch die Kopplungskonstante J_3 , welcher bei mittlerem Druck angenommen wurde. Von Zustand 1 bei niedrigem Druck waren somit jeweils die Übergänge ($1 \rightarrow 3$) und ($1 \rightarrow 2$) möglich.

Aus der Form des stark nichtlinearen Verlaufs der Kopplungskonstanten ließen sich mittels Gleichung 2.15, beziehungsweise Gleichung 2.17, aus der Gibbs-Funktion Werte der freien Energieänderung ΔG° und der molaren Volumenänderung ΔV° bestimmen. Aufgrund der großen Fehler war hier eine Analyse des Kompressionsfaktors $\Delta\beta^\circ$ nicht sinnvoll.

Nicht bei allen mit dem Zweizustandsmodell gefitteten Daten war das Vorzeichen von ΔG° eindeutig definiert. Begann die Druckabhängigkeit bei 0,1 MPa in der Mitte, nahe des Umkehrpunktes, der sigmoidalen Kurve, waren beide Vorzeichen mathematisch äquivalent. Die Analyse der vorgestellten Daten beschränkte sich dann auf den Fit mit dem kleineren χ^2 -Wert. Mit Anspruch auf Vollständigkeit sind in Tabelle 4.12 aber auch die alternativen Fit-Minima angegeben.

Die mittlere Änderung der freien Energie ΔG° ergab sich zu $12,8 \text{ kJ mol}^{-1}$. Ihre Standardabweichung von $11,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ deutete bereits auf sehr unterschiedliche Resultate von Aminosäure zu Aminosäure hin. Mit Ausnahme von Gln ($-2,0 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$), Ile ($-4,0 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$) und Thr ($-1,8 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) wiesen alle Änderungen ein positives Vorzeichen der freien Energie beim Übergang von Zustand 1 nach Zustand 2 auf. Met zeigte mit $43,7 \pm 11,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ die größte Energiedifferenz zwischen Zustand 1 und 2, das bereits erwähnte Thr die betragsmäßig kleinste.

Die molare Volumenänderung ΔV° ergab einen hohen durchschnittlichen Wert von -119 ml mol^{-1} , bei einer Standardabweichung von 82 ml mol^{-1} . Die somit ebenfalls stark schwankenden Ergebnisse erstreckten sich von $(-31 \pm 17) \cdot 10^1 \text{ ml mol}^{-1}$ (Leu) bis $-30 \pm 2 \text{ ml mol}^{-1}$ (Gln).

4.2.3 Korrelationsanalyse der Ergebnisse

Um einfache mathematische Zusammenhänge zwischen den in diesem Kapitel dargestellten Messgrößen aufzeigen zu können, wurden lineare Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. Somit konnten die Observablen auf ihre linearen Zusammenhänge hin analysiert werden. Hierbei mussten stets die Vorzeichen der betrachteten Werte bedacht werden, um aus einem positiven oder negativen Koeffizienten eine positive oder negative Korrelation zu schließen.

Innerhalb der Aminosäuren an Position 3 war eine positive Korrelation ($-0,51$) zwischen dem gefitteten (negativen) J_1 und der Größe der Änderung der freien Energie feststellbar. Ein starker ($-0,79$) linearer Zusammenhang offenbarte sich zwischen der Änderung der freien Energie und des molaren Volumens. Desweiteren korrelierte ein stark negativer Wert der $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstante bei 0,1 MPa mit einem ebenfalls stark negativen Wert bei 200 MPa ($0,56$), was lediglich den prozentual kleinen Änderungen der Kopplungskonstante während des Druckanstiegs Rechnung trägt. Trotzdem hängt der Betrag dieser Änderung ganz wesentlich von der Stärke der Kopplung bei 200 MPa ab ($0,84$) (Tabelle 4.13).

	J_1	J_2	ΔG_{12}^0	ΔV_{12}^0	J_{NH}		ΔJ_{NH}	^{15}N			$^1H^N$			$^1H^a$		
					0,1 MPa	200 MPa		δ_0	B_1	B_2	δ_0	B_1	B_2	δ_0	B_1	B_2
J_1		0.09	-0.51	0.21	0.68	0.05	-0.38	0.04	-0.42	0.18	-0.34	0.29	-0.10	-0.30	-0.04	0.10
J_2			0.02	-0.22	0.35	0.73	0.65	-0.04	0.04	-0.33	-0.18	0.10	-0.10	0.06	0.00	0.10
ΔG_{12}^0				-0.79	-0.09	0.22	0.31	0.11	-0.04	-0.06	0.15	-0.44	0.23	0.00	-0.39	0.14
ΔV_{12}^0					-0.08	-0.28	-0.27	0.00	0.27	-0.14	-0.16	0.45	-0.29	0.26	0.27	0.10
J_{NH} 0,1 MPa						0.56	0.02	0.29	-0.50	-0.01	-0.46	0.34	-0.08	-0.19	-0.34	0.29
200 MPa							0.84	0.13	-0.03	-0.42	-0.34	0.20	-0.21	-0.03	-0.27	0.23
ΔJ_{NH}								-0.03	0.29	-0.50	-0.10	0.02	-0.20	0.08	-0.10	0.09
δ_0									-0.75	0.37	-0.23	0.12	-0.04	0.30	-0.14	0.07
^{15}N B_1										-0.68	0.14	-0.05	-0.20	0.12	0.08	0.10
B_2											0.42	-0.37	0.67	-0.34	0.33	-0.54
δ_0												-0.62	0.47	0.11	0.23	-0.50
$^1H^N$ B_1													-0.80	0.33	-0.09	0.49
B_2														-0.48	0.16	-0.51
$^1H^a$ δ_0															-0.25	0.27
B_1																-0.70
δ_0	0.15	-0.11	-0.14	-0.10	-0.02	-0.13	-0.14	-0.26	-0.10	0.37	0.54	-0.07	0.11	-0.32	0.37	-0.25
Ala4 $^1H^a$ B_1	-0.20	-0.29	0.05	-0.11	-0.46	-0.45	-0.24	-0.20	0.00	0.22	0.64	-0.18	0.01	-0.06	0.25	-0.18
B_2	0.08	0.17	0.30	-0.08	0.35	0.52	0.40	0.24	-0.01	-0.33	-0.41	0.10	-0.11	-0.05	-0.30	0.39
δ_0	0.13	-0.20	-0.04	-0.19	-0.03	-0.22	-0.24	-0.08	-0.27	0.47	0.59	-0.18	0.23	-0.34	0.20	-0.23
Ala4 $^1H^b$ B_1	0.20	-0.08	0.05	-0.20	0.10	-0.05	-0.12	0.00	-0.32	0.28	0.29	-0.08	0.04	-0.44	0.18	-0.03
B_2	-0.35	0.19	0.24	-0.26	-0.29	0.06	0.27	-0.15	0.21	-0.42	0.30	-0.10	-0.16	0.19	-0.19	0.23
δ_0	0.34	0.01	-0.28	0.10	0.31	0.06	-0.13	0.12	-0.45	0.37	0.30	0.11	-0.02	-0.14	0.21	-0.15
Ala4 $^1H^N$ B_1	0.08	0.10	0.36	-0.37	0.42	0.33	0.13	0.41	-0.31	-0.16	-0.65	0.29	-0.34	0.04	-0.49	0.35
B_2	0.23	-0.18	-0.16	0.17	-0.06	-0.19	-0.19	-0.19	0.03	0.06	0.15	-0.21	0.29	-0.26	-0.01	0.12
δ_0	0.12	-0.37	-0.15	-0.13	-0.19	-0.51	-0.50	-0.09	-0.31	0.74	0.61	-0.32	0.47	-0.38	0.42	-0.58
Gly1 $^1H^a$ B_1	0.02	-0.10	0.01	0.00	0.13	0.05	-0.03	0.05	0.13	0.01	-0.40	0.05	0.06	-0.10	-0.06	0.08
B_2	-0.02	-0.03	-0.06	0.08	-0.20	-0.21	-0.12	-0.08	-0.04	0.08	0.34	-0.03	0.04	0.07	-0.12	0.13
δ_0	-0.14	-0.39	0.12	-0.31	-0.34	-0.48	-0.36	-0.38	0.19	0.24	0.75	-0.47	0.42	-0.11	0.20	-0.48
Gly1 $^1H^N$ B_1	0.03	-0.17	-0.04	-0.09	0.01	-0.08	-0.11	0.65	-0.61	0.54	0.15	-0.23	0.13	0.03	0.17	-0.43
B_2	-0.43	0.31	0.27	0.04	-0.08	0.09	0.16	-0.40	0.51	-0.59	-0.04	0.00	0.01	0.19	-0.15	0.35
δ_0	0.17	-0.24	-0.19	-0.14	-0.16	-0.33	-0.29	-0.26	-0.14	0.59	0.46	-0.11	0.31	-0.40	0.53	-0.57
Gly2 $^1H^a$ B_1	-0.31	-0.35	0.29	-0.17	-0.12	-0.10	-0.04	-0.16	0.10	0.20	0.28	-0.16	0.12	-0.13	0.28	-0.20
B_2	0.30	0.22	-0.10	-0.03	0.02	0.04	0.04	0.02	-0.12	-0.04	-0.09	0.08	-0.12	-0.05	-0.23	0.19
δ_0	-0.16	-0.19	0.25	-0.31	-0.42	-0.28	-0.07	-0.49	0.54	-0.19	0.55	-0.36	0.12	-0.12	0.09	-0.03
Gly2 $^1H^N$ B_1	-0.26	-0.40	0.26	-0.20	-0.28	-0.25	-0.11	0.00	0.13	0.09	0.36	-0.25	0.24	0.11	-0.35	-0.05
B_2	0.20	0.18	-0.42	0.29	0.08	-0.09	-0.17	-0.17	-0.10	0.22	0.17	0.01	0.31	-0.14	0.28	-0.27
$M(R)^a$	0.01	0.17	0.10	0.14	0.28	0.34	0.23	0.20	0.13	-0.57	-0.38	0.23	-0.29	0.49	-0.61	0.48
$P\beta^b$	0.51	0.43	-0.27	0.12	0.61	0.43	0.12	-0.05	-0.25	-0.26	-0.82	0.60	-0.40	-0.22	0.03	0.35
$\Delta\Delta G^c$	-0.35	-0.26	0.15	-0.10	-0.63	-0.43	-0.11	-0.61	0.51	0.26	0.51	-0.67	0.51	-0.42	0.48	-0.40

Tabelle 4.13: **Lineare Korrelationskoeffizienten nach Pearson.** J_1 , J_2 , ΔG_{12}^0 und ΔV_{12}^0 aus Tabelle 4.12; J_{NH} 0,1MPa und J_{NH} 200MPa aus Tabelle 4.11; ΔJ ist die Differenz aus J_{NH} 0,1MPa und J_{NH} 200MPa; δ_0^N , B_1^N und B_2^N aus Tabelle 4.6; δ_0^{HN} , B_1^{HN} und B_2^{HN} aus Tabelle 4.2; $\delta_0^{H\alpha}$, $B_1^{H\alpha}$ und $B_2^{H\alpha}$ aus Tabelle 4.3; δ_0 , B_1 und B_2 von Ala4, Gly1 und Gly2 aus Tabellen 9.1, 9.2 und 9.3. ^amolare Masse der Seitenkette; ^b β -Neigung $P\beta$ aus [Fas89]; ^cexperimentell hergeleitete β -Neigung $\Delta\Delta G$ aus [Kim93]; fett gedruckte Zahlen: Betrag $\geq 0,4$.

Bei den Druckabhängigkeiten der Rückgrat Amidgruppen zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen einer in Richtung Hochfeld verschobenen Resonanzfrequenz und einem starken Druckeffekt erster Ordnung (^{15}N : -0,75; ^1H : -0,62), welcher wiederum zu einer starken Krümmung führte (^{15}N : -0,68; ^1H : -0,80). Ebenso schien der asymptotische Verlauf der chemischen Verschiebung bei hohen Drücken für ^{15}N und ^1H (0,67) eine gemeinsame Ursache zu haben. Stark negative Werte der Kopplungskonstanten bei 0,1 MPa bedingten offenbar eine große lineare Druckantwort der chemischen Verschiebung von ^{15}N (-0,50). Eine stark negative Kopplung bei 200 MPa dagegen korrelierte noch leicht mit einer geringen Krümmung des Verlaufs der druckabhängigen Resonanzfrequenz (-0,42). Bei den Amidprotonen fehlte allerdings dieser Zusammenhang zwischen der Kopplungskonstanten und dem Druckverhalten, welches aber leicht mit ΔG° (-0,44) und ΔV° (0,45) interagierte. Hier zeigte sich vielmehr eine leichte Korrelation (-0,46) zwischen der Stärke der $^1J_{\text{N-H}}$ -Kopplung und einer in Richtung Tieffeld verschobenen chemischen Verschiebung bei 0,1 MPa, was wiederum mit einer nur leichten Krümmung des Druckverhaltens zusammenhing (0,42) (Tabelle 4.13).

Alle chemischen Verschiebungen der Aminosäuren 1, 2 und 3 korrelierten positiv mit der des Amidprotons der Aminosäure an Position 3: Ala4 H^α (0,54), Ala4 H^β (0,59), Ala4 H^N (0,30), Gly1 H^α (0,61), Gly1 H^N (0,75), Gly2 H^α (0,46), Gly2 H^N (0,55).

Eine große molare Masse der Seitenkette verursachte zudem eine leichte Verschiebung der H^α -Resonanz der selben Aminosäure in Richtung Tieffeld (0,49), sowie eine starke Druckabhängigkeit dieser sowohl erster (-0,61) als auch zweiter Ordnung (0,48). Ebenso positiv korrelierte die Krümmung des Druckverhaltens der ^{15}N chemischen Verschiebung mit einer komplexen Seitenkette (-0,57) (Tabelle 4.13).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 pH-Abhängigkeit der Ergebnisse

Die chemische Verschiebung speziell von Amidprotonen ist nicht nur stark vom Druck abhängig, sondern auch von Temperatur und pH-Wert [Kja11, Bun79b]. Bei Atmosphärendruck kann die Temperaturabhängigkeit der Frequenz gut mit aminosäurespezifischen Temperaturkoeffizienten bestimmt werden [Kja11]. Aufgrund der Tatsache der Druckabhängigkeit des pK-Wertes geladener Gruppen, sowohl des Puffers als auch innerhalb der Peptide, kann steigender Druck auch eine pH-Drift der Probenlösung zur Folge haben, welche wiederum die chemische Verschiebung beeinflusst. Tris-HCl weist nur eine relativ kleine Änderung des pK-Wertes mit dem Druck auf, verglichen mit beispielsweise Phosphatpuffer [Qui05], weshalb es meistens Verwendung in HP-NMR-spektroskopischen Experimenten an Proteinen findet. Um ähnliche Bedingungen zu schaffen, wurde den untersuchten Peptidlösungen ebenfalls Tris-HCl zugesetzt, obwohl dessen Pufferkapazität bei pH 6,7 nicht allzu hoch ist. Vielmehr kann es in vorliegender Studie als pH-Sensor benutzt werden, da die Druck- und pH-Abhängigkeit von Tris-HCl von Huberth [Hub11] bereits untersucht wurde. Bei 200 MPa steigt der pH-Wert im Mittel um 0,01 Einheiten (Tabelle 4.1). Arnold et al. [Arno2b] zeigte bereits, dass Druckkoeffizienten von Modellpeptiden nur dann signifi-

kant vom pH-Wert abhängen, wenn der Seitenketten pK-Wert nahe genug am pH-Wert der untersuchten Peptidlösung ist. Dies ist in vorliegender Arbeit nur der Fall bei Histidin, weshalb hier Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurden. Dementsprechend konnte keine signifikante Korrelation zwischen der chemischen Verschiebung von Tris-HCl und den hier diskutierten Ergebnissen entdeckt werden.

In Random Coil Peptiden befindet sich die Histidin Seitenkette in einem schnellen chemischen Gleichgewicht zwischen protonierten und deprotonierten Zuständen des Imidazolringes. Beispielsweise liegt der pKa-Wert dieser in Gly-Gly-His-Ala bei 7,0 [Bun79a]. Eben diese Tautomerie beeinflusst möglicherweise auch die Druckantwort der Rückgrat Amidgruppe. Aus diesem Grund wurde das Peptid mit Histidin an der Xxx-Position bei zwei unterschiedlichen pH-Werten gemessen; mit vollständig protoniertem (pH 4,0) und vollständig deprotoniertem (pH 8,5) Imidazolring. Weil bei hohen pH-Werten ein Polarisations-transfer von ^1H auf ^{15}N innerhalb der Amidgruppe des Rückgrates wegen des verstärkten chemischen Austausches nicht möglich ist, wurde in diesem Fall der Transfer vom benachbarten H^α -Proton mittels einer HA(CA)N-Pulssequenz durchgeführt. Im Imidazolring der Seitenkette war generell im HSQC-Experiment kein Polarisations-transfer möglich. Allerdings konnten die ^{15}N Resonanzen hier bei pH 4,0, analog zur Resonanz der Amidgruppe bei pH 8,5, mittels einer HCN-Sequenz detektiert (Abbildung 4.11).

4.3.2 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung

Die sehr umfangreichen Ergebnisse der Untersuchungen der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung in den Modellpeptiden soll hier nochmals zusammengefasst und mit einer früheren Studie verglichen werden.

4.3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Random Coil Werte der chemischen Verschiebung von Protonen erstrecken sich vom stickstoffgebundenen $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Proton der Tryptophan Seitenkette bei $10,1972 \pm 0,0004$ ppm (Abbildung 4.2) bis zur Methylgruppe $\text{H}^{\delta 2}$ von Isoleucin bei $0,8661 \pm 0,0004$ ppm. Das Spektrum der ^{15}N -Resonanzen reicht von Prolin in cis-Konformation mit $135,033 \pm 0,001$ ppm bis zu N^ϵ der Lysin Seitenkette bei $32,614 \pm 0,013$ ppm (Abbildung 4.10).

Bei den Wasserstoffkernen besitzen die Amidprotonen die größte Druckabhängigkeit sowohl in erster als auch in zweiter Ordnung. Das insgesamt größte B_1^H weist Threonin mit $0,755 \pm 0,024$ ppm GPa^{-1} auf, die stärkste Krümmung findet sich bei Tyrosin mit $-0,82 \pm 0,25$ ppm GPa^{-2} . Am stabilsten gegenüber Druckänderungen verhalten sich die Resonanzen von Cystein $\text{H}^{\beta 1/\beta 2}$ und Threonin H^β mit $-0,001 \pm 0,001$ ppm GPa^{-1} beziehungsweise mit $0,001 \pm 0,003$ ppm GPa^{-1} .

Alle Stickstoff Resonanzen, sowohl des Rückgrates als auch der Seitenketten, verschieben sich mit steigendem Druck in Richtung Tieffeld, was für die erwartete Verkürzung der Wasserstoffbrückenbindungen spricht [Asa98]. Ein solcher Effekt wurde bereits früher von Kalbitzer et al. beschrieben [Kaloo]. Dieser Sachverhalt manifestiert sich in einem positiven B_1^N aller Aminosäuren. Dagegen weisen alle Koeffizienten zweiter Ordnung B_2^N hier ein negatives Vorzeichen auf, was insgesamt eine Sättigung der Änderung der chemischen Verschiebung bei hohen Drücken vermuten lässt. Selber Zusammenhang wurde bei den

Amidprotonen ermittelt (Tabelle 4.2). Prolin weist als cis-Isomer den kleinsten ^{15}N Druckkoeffizienten erster Ordnung der Rückgrat Amidgruppen auf ($1,36 \pm 0,02 \text{ ppm GPa}^{-1}$), aber in der trans-Konfiguration einen durchschnittlichen ($2,45 \pm 0,02 \text{ ppm GPa}^{-1}$) (Tabelle 4.6). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Mechanismus der Wasserstoffbrückenbindung, welche in der cis-Konfiguration zu vernachlässigen sein sollte, da eine Wechselwirkung zwischen dem Wasser und dem Stickstoff nahezu auszuschließen ist.

Die Kombinationen der Vorzeichen der Druckkoeffizienten erster (B_1) und zweiter (B_2) Ordnung bilden vier Gruppen, wobei nur diejenigen mit unterschiedlichem Vorzeichen zu einem asymptotischen Verhalten der chemischen Verschiebung bei hohen Drücken führen.

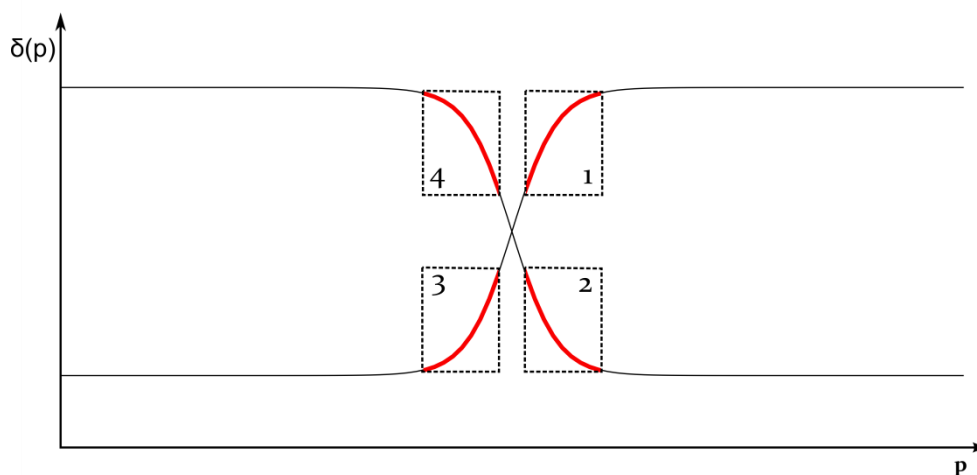


Abbildung 4.15: **Vorzeichenkombinationen der Druckkoeffizienten.** Vier mögliche Kombinationen der Vorzeichen von B_1 und B_2 : $B_1 > 0$ in Bereichen 1 und 3; $B_1 < 0$ in Bereichen 2 und 4; $B_2 > 0$ in Bereichen 2 und 3; $B_2 < 0$ in Bereichen 1 und 4.

Dieser Zusammenhang eines anscheinend sättigenden (Abbildung 4.15 Bereiche 1 und 2), beziehungsweise nicht sättigenden (Abbildung 4.15 Bereiche 3 und 4) Druckverhaltens beschränkt sich allerdings lediglich auf den untersuchten Druckbereich von 0,1 MPa bis 200 MPa. Gleichung 2.12 stellt eine Taylor-Näherung der globalen sigmoidalen Gleichung 2.9 dar. Das darin zugrunde gelegte Zweizustandsmodell lässt sowohl Übergänge von niedriger chemischer Verschiebung bei niedrigen Drücken hin zu großer chemischer Verschiebung bei hohen Drücken zu, als auch von großem $\delta(p)$ bei Niederdruck hin zu kleineren Werten bei Hochdruck. Eine Taylor-Näherung für nur kleine Änderungen des Druckes liefert so dann aus den beiden sigmoidalen Funktionen vier Abschnitte eines Zusammenhanges der Vorzeichen des Polynoms zweiten Grades (Abbildung 4.15). Es ist somit immer von einem sättigenden Verhalten der Änderung der chemischen Verschiebung bei extrem hohen Drücken auszugehen, auch wenn dieses teils erst weit jenseits von 200 MPa eintreten mag.

Sequenzabhängige Korrekturfaktoren für die chemische Verschiebung sind bereits seit längerem bekannt, beispielsweise aus symmetrischen Pentapeptiden [Schoi]. Völlig neu ist allerdings die in vorliegender Arbeit durchgeführte Analyse der sequenzabhängigen Änderung der chemischen Verschiebung mit dem Druck. Tabelle 9.2 im Anhang verdeutlicht, dass sich das Druckverhalten von Glycin und Alanin zwar nicht umkehrt aufgrund verschiedener Aminosäurereste in der Nachbarschaft, dass dieses aber doch sehr wohl verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Das Krümmungsverhalten dagegen (Tabelle 9.3) kann von sequenzabhängigen Effekten durchaus umgekehrt werden.

4.3.2.2 Vergleich der geschützten und ungeschützten Peptide

Die druckabhängigen chemischen Verschiebungen von Protonen im ungeschützten Modellpeptid Gly-Gly-Xxx-Ala wurden bei 500 MHz Resonanzfrequenz bereits gemessen [Arno2b]. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit terminal geschützte Peptide Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ untersucht, deren N- und C-Termini unabhängig vom pH-Wert ungeladen bleiben. Zudem wurde bei 800 MHz Protonenresonanz und mit einem stark verbesserten Hochdrucksystem gemessen, was zu enorm gesteigerter Genauigkeit, speziell im Bereich der Nichtlinearitäten, führte. Die niedrigere Temperatur dieser Studie von 283 K, im Vergleich zu 305 K bei Arnold et al. [Arno2b], sollte zu einer tieffeldverschobenen Resonanz der Rückgrat Amidprotonen von 0,17 ppm [Kja1] führen. Trotzdem unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen der beiden Peptide im Mittel lediglich um $0,005 \pm 0,05$ ppm, was auf pH-Einflüsse der nicht geschützten Variante zurückzuführen ist (Abbildung 4.16 - links). Der lineare Korrelationskoeffizient der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen beträgt 0,90.

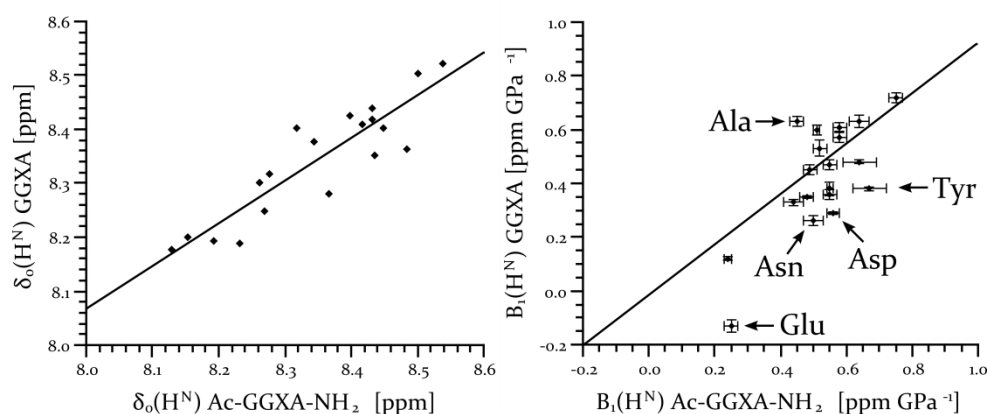


Abbildung 4.16: Vergleich der Resultate der Amidprotonen. Chemische Verschiebung (links) und Druckkoeffizienten erster Ordnung (rechts) der Rückgrat Amidprotonen mit markierten Aminosäuren größter Abweichung. Abszisse: geschütztes Modellpeptid aus vorliegender Arbeit bei pH 6,7 und $T = 283$ K; Werte aus Tabelle 4.2. Ordinate: ungeschütztes Modellpeptid bei pH 5,4 und $T = 305$ K; Werte aus [Arno2b]. Die linearen Korrelationskoeffizienten sind 0,90 (δ_0) und 0,74 (B_1). Durchgezogene Linien: linearer Fit der Daten.

Der Mittelwert der Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1^{HN} der Amidprotonen im Peptid Gly-Gly-Xxx-Ala ist mit $0,423 \text{ ppm GPa}^{-1}$ nur geringfügig kleiner als derjenige in den hier untersuchten geschützten Peptiden ($0,523 \text{ GPa}^{-1}$). Zudem lässt sich der lineare Korrelationskoeffizient der B_1^{HN} trotz mancher Abweichung zu 0,74 berechnen. In erster Näherung verschieben sich in beiden Peptiden alle Resonanzen der Amidprotonen mit steigendem Druck in Richtung Tieffeld. Die einzige Ausnahme hiervon stellte Glutamat dar. Hierbei wurde von Arnold et al. ein negatives B_1^{HN} gefunden (Abbildung 4.16 - rechts). Dieses abnorme Druckverhalten ist auf eine Wechselwirkung mit der negativ geladenen C-terminalen Carboxylgruppe zurückzuführen, da eine Methylierung wieder zu einer tieffeldverschobenen Resonanz führte [Kre06]. Die größten Unterschiede der beiden Peptide in den Koeffizienten erster Ordnung der Amidprotonen wurden bei Glutamat ($0,384 \text{ ppm GPa}^{-1}$), Tyrosin

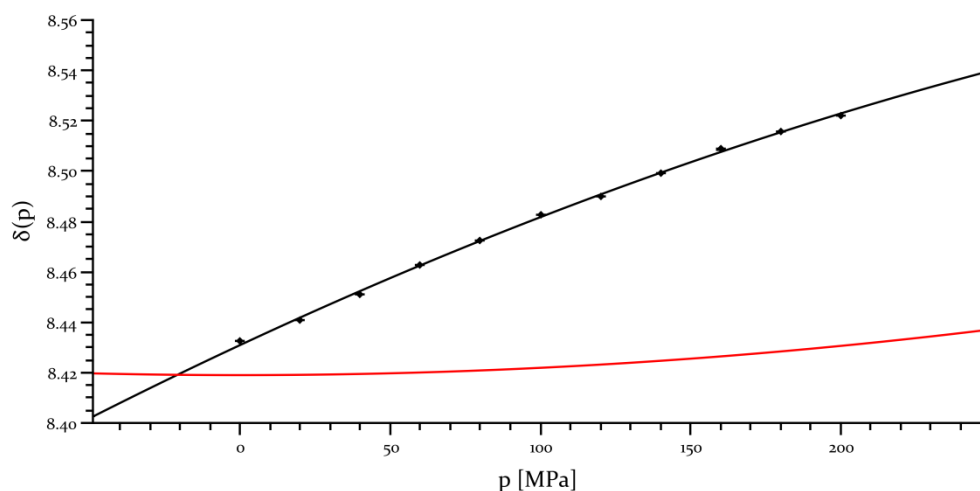


Abbildung 4.17: **Druckabhängige chemische Verschiebung des Amidprotons von Aspartat.** Druckantwort der chemischen Verschiebung des Amidprotons von Asp₃ in Ac-Gly-Gly-Asp-Ala-NH₂ bei 283 K und pH 6,7 gemessen bei 800 MHz Protonenresonanzfrequenz. Schwarze Linie: Fit der Daten mit Gleichung 2.12 und den Parametern aus Tabelle 4.2 mit einem Determinationskoeffizienten $R^2 < 0,99$. Rote Linie: Polynom zweiten Grades mit Parametern aus [Arnoz^b].

(0,288 ppm GPa⁻¹), Aspartat (0,266 ppm GPa⁻¹), Asparagin (0,235 ppm GPa⁻¹) und Alanin (0,179 ppm GPa⁻¹) beobachtet (Abbildung 4.16 - rechts). Im beispielhaften Fall von Aspartat ist in Abbildung 4.17 ein direkter Vergleich der beiden Polynome zu sehen, welche die Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebung im geschützten und ungeschützten Peptid beschrieben.

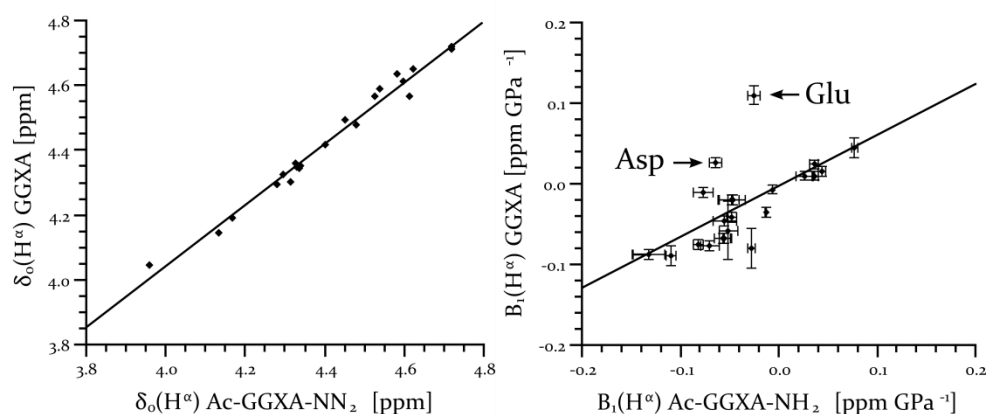


Abbildung 4.18: **Vergleich der Resultate der H^α-Protonen.** Chemische Verschiebung (links) und Druckkoeffizienten erster Ordnung (rechts) der H^α-Protonen mit markierten Aminosäuren größter Abweichung. Abszisse: geschütztes Modellpeptid aus vorliegender Arbeit bei pH 6,7 und T = 283 K; Werte aus Tabelle 4.3. Ordinate: ungeschütztes Modellpeptid bei pH 5,4 und T = 305 K; Werte aus [Arnoz^b]. Die linearen Korrelationskoeffizienten sind 0,99 (δ_0) und 0,65 (B_1). Durchgezogene Linien: linearer Fit der Daten.

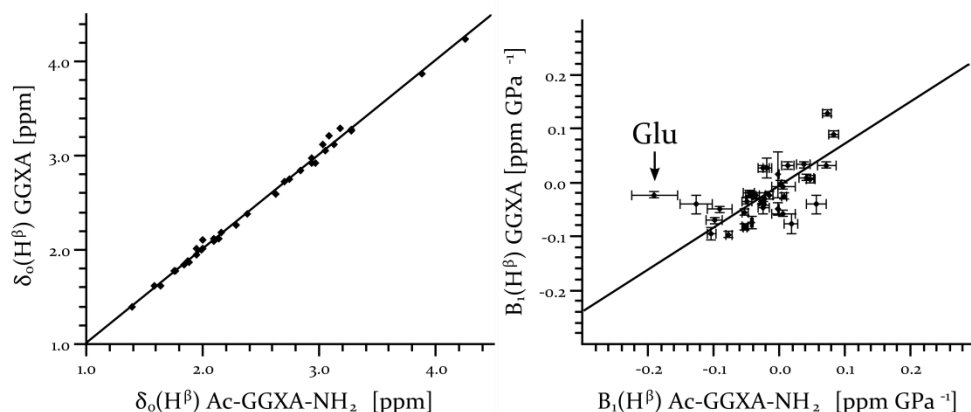


Abbildung 4.19: **Vergleich der Resultate der H^β -Protonen.** Chemische Verschiebung (links) und Druckkoeffizienten erster Ordnung (rechts) der H^β -Protonen mit markierter Aminosäure größter Abweichung. Abszisse: geschütztes Modellpeptid aus vorliegender Arbeit bei pH 6,7 und $T = 283$ K; Werte aus Tabelle 4.4. Ordinate: ungeschütztes Modellpeptid bei pH 5,4 und $T = 305$ K; Werte aus [Arno2b]. Die linearen Korrelationskoeffizienten sind $> 0,99$ (δ_0) und $0,61$ (B_1). Durchgezogene Linien: linearer Fit der Daten.

Im Gegensatz zum in vorliegender Arbeit gefundenen asymptotischen Verhalten der Änderung der chemischen Verschiebung bei hohen Drücken zeigen bei Arnold et al. [Arno2b] die nichtlinearen Anteile der Druckantworten ein wechselndes Vorzeichen von Aminosäure zu Aminosäure, was auf die niedrigere Resonanzfrequenz sowie ein unempfindlicheres Gesamtsystem und damit auf eine geringere Auflösung und größere Fehler zurückzuführen ist. Überhaupt wurde bei Arnold et al. [Arno2a] nur bei den Amidprotonen ein Polynom zweiten Grades zur Beschreibung der Druckabhängigkeit herangezogen.

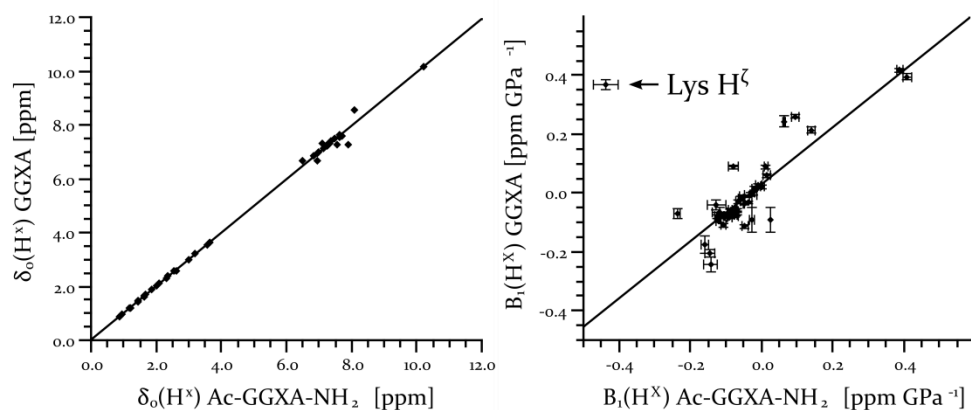


Abbildung 4.20: **Vergleich der Resultate der Seitenketten ohne H^β -Protonen.** Chemische Verschiebungen (links) und Druckkoeffizienten erster Ordnung (rechts) mit markierter Aminosäure größter Abweichung. Abszisse: geschütztes Modellpeptid aus vorliegender Arbeit bei pH 6,7 und $T = 283$ K; Werte aus Tabelle 4.5. Ordinate: ungeschütztes Modellpeptid bei pH 5,4 und $T = 305$ K; Werte aus [Arno2b]. Die linearen Korrelationskoeffizienten sind $> 0,99$ (δ_0) und $0,57$ (B_1) mit Lysin und $0,91$ ohne. Durchgezogene Linien: linearer Fit der Daten.

Bei den H^{α} -Protonen fällt der Unterschied der chemischen Verschiebungen bei 0,1 MPa der beiden Peptide erwartungsgemäß geringer aus, als dies bei den stärker pH-abhängigen Amidprotonen der Fall ist. Der lineare Korrelationskoeffizient ist hier mit 0,99 anzugeben (Abbildung 4.18 - links). Der Mittelwert der Druckkoeffizienten ist in Gly-Gly-Xxx-Ala mit $-0,025 \text{ ppm GPa}^{-1}$ wiederum geringfügig kleiner als der in Tabelle 4.3 angegebene Wert von $-0,034 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Der lineare Korrelationskoeffizient der $B_i^{H^{\alpha}}$ berechnet sich zu 0,65. Die größten Abweichungen der Druckabhängigkeit erster Ordnung werden hier wieder bei Glutamat ($-0,135 \text{ ppm GPa}^{-1}$) und Aspartat ($-0,090 \text{ ppm GPa}^{-1}$) gefunden (Abbildung 4.18).

Die chemischen Verschiebungen der H^{β} -Protonen bei Atmosphärendruck korrelieren linear sehr stark miteinander ($> 0,99$) (Abbildung 4.19 - links). Ebenso verhalten sie sich mit steigendem Druck in den geschützten wie in den ungeschützten Peptiden nahezu gleich. Der mittlere Druckkoeffizient erster Ordnung in Gly-Gly-Xxx-Ala beträgt $-0,022 \text{ ppm GPa}^{-1}$, der von Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ $-0,024 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Wieder ist mit Glutamat ($-0,167 \text{ ppm GPa}^{-1}$) die einzig größere Abweichung zu nennen (Abbildung 4.19).

Bei den übrigen Protonen der Seitenketten zeigt sich hinsichtlich der chemischen Verschiebung bei 0,1 MPa erneut ein stark linearer Zusammenhang beider Peptide mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von $> 0,99$ (Abbildung 4.20 - links). Zudem beträgt die mittlere Abweichung der Druckkoeffizienten erster Ordnung zwischen beiden Peptiden lediglich $0,05 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Allerdings weist hier Lysin H^{ζ} mit einer Differenz von $-0,806 \text{ ppm GPa}^{-1}$ einen großen Unterschied auf (Abbildung 4.20 - rechts). Bei Lysin wurde von Arnold et al. eine Verschiebung der Protonenresonanz in Richtung Tieffeld detektiert [Arno2b]. Im geschützten Peptid, welches in vorliegender Arbeit untersucht wurde, ist dagegen eine deutliche Verschiebung in Richtung Hochfeld auszumachen (Abbildung 4.10). Der lineare Korrelationskoeffizient der B_i errechnet sich zu lediglich 0,57. Schließt man allerdings den stark abweichenden Wert von Lysin aus, so ergibt er sich zu 0,91.

4.3.3 $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten der Rückgrat Amidgruppen

Die Spin-Spin-Kopplungen der Amidgruppen des Rückgrates sollten in der Kernspinresonanzspektroskopie an Proteinen eigentlich von besonderem Interesse sein, werden sie doch stark von Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst und sind somit bei der Proteinfaltung großen Änderungen unterzogen. Trotzdem existiert bis heute nur eine einzige Untersuchung ihrer Druckabhängigkeit im Protein *HPr* von *Staphylococcus carnosus* [Kaloo]. Es konnte hier gezeigt werden, dass die $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstante sowohl eine starke druckinduzierte Abhängigkeit aufweist, als auch signifikanten Schwankungen von Aminosäure zu Aminosäure unterliegt. Um nun die aus der Umstrukturierung von Proteinen resultierende Änderung der Kopplungskonstante von trivialen, kompressions-bedingten Effekten zu separieren, ist es lohnenswert, bei Modellpeptiden ein gesondertes Augenmerk auf sie zu haben.

Bereits bei atmosphärischem Druck weisen alle hier untersuchten Peptide signifikant unterschiedliche $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten auf (Tabelle 4.11). Dies führt zu einer aminosäurespezifischen Variation der Werte von 3,4 Hz bei einem Mittelwert von $-94,5 \text{ Hz}$ bei 0,1 MPa. Dieser Wert wiederum weicht signifikant ab von Mittelwerten von $-93,2 \text{ Hz}$ sowie $-93,6 \text{ Hz}$, welche bereits für die intrinsisch ungefalteten Proteine *tau* und *α -Synuclein* publiziert wurden [Xia13]. Ein Faktor, welcher zumindest zum Teil den tieferen, mehr negativen Wert der $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstante in den Tetrapeptiden erklären könnte, ist der Beitrag der dynamischen Frequenz-Verschiebung. Diese sollte zu einem kleinen Sinken des Wertes

der Konstante um rund 0,5 Hz in Proteinen führen [Tja96]. Die $^1J_{N-H}$ Kopplungen der einzelnen Aminosäuren in den hier untersuchten Modellpeptiden zeigen eine mittlere bis gute Korrelation mit den aminosäurespezifischen Mittelwerten der zwei intrinsisch ungeordneten Proteine *tau* und α -Synuclein (Abbildung 4.21): Die linearen Korrelationskoeffizienten sind 0,58 bei *tau*, beziehungsweise 0,72 bei α -Synuclein. Das, in Verbindung mit den

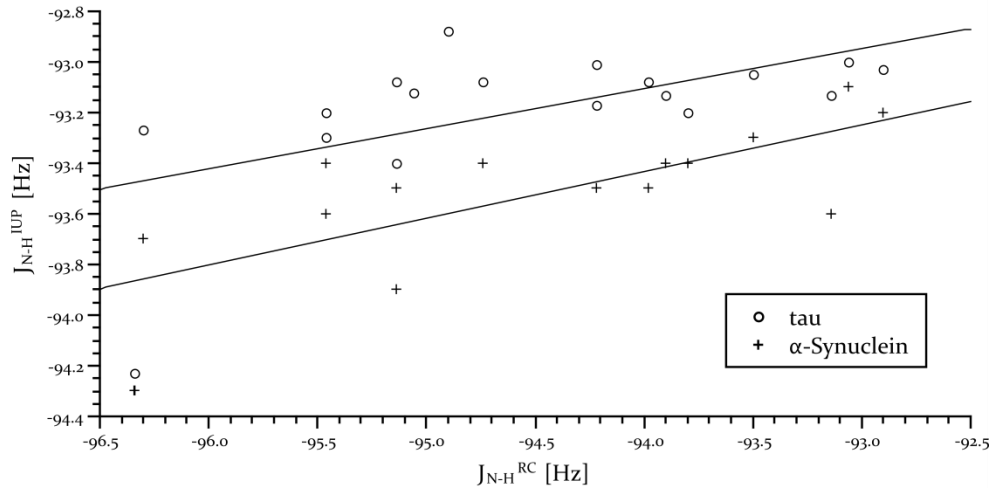


Abbildung 4.19: Korrelation der Aminosäure spezifischen Random Coil Werte der Amid-Kopplung der Modellpeptide J_{N-H}^{RC} mit den Werten J_{N-H}^{IUP} der intrinsisch ungeordneten Proteine *tau* (o) und α -Synuclein (+). Die linearen Korrelationskoeffizienten sind 0,58 (*tau*) und 0,72 (α -Synuclein). Linien: Linearer Fit der Daten.

abweichenden Mittelwerten, legt den Schluss nahe, dass sich die Random-Coil-Modellpeptide in Bezug auf die $^1J_{N-H}$ -Kopplung anders verhalten als intrinsisch ungeordnete Proteine. Eine mögliche Erklärung beruht auf sequenzspezifischen Effekten benachbarter Aminosäuren oder aber auch auf einem doch vorhandenen, jedoch geringen Grad an Sekundärstrukturen in den beiden Proteinen. Gestützt wird diese Vermutung zudem von einem relativ hohen linearen Korrelationskoeffizienten von 0,89 der aminosäurespezifischen Kopplungskonstanten der beiden Proteine untereinander. In diesem Bild wäre α -Synuclein mehr Random-Coil-artig als *tau*.

Auf Druckerhöhung reagieren die indirekten Spin-Spin-Kopplungen mit einer Änderung ihrer Stärke, in den meisten Fällen mit einem kontinuierlich steigenden Absolutwert der Konstante (Tabelle 4.11). Als Ausnahmen davon sind zu nennen: Glutamat, Histidin, Phenylalanin, Serin, Tyrosin und Valin. Bei einem Druck von 200 MPa ist die Variation der aminosäurespezifischen Kopplungskonstanten signifikant erhöht, im Vergleich zu ihrer Streuung bei einem Umgebungsdruck von 0,1 MPa. Außer in den Fällen von Valin und Arginin, deren Kopplungskonstanten entweder druckunabhängig oder mit diesem linear verlaufen, war eine thermodynamische Analyse der Daten möglich. Ursächlich dafür ist die ausgeprägte Nichtlinearität der Druckabhängigkeit der Kopplungskonstanten dieser Aminosäuren, welche mit Hilfe eines Zweizustandsmodells gefittet werden konnte. Ein typisches Beispiel für eine solch sigmoidale Druckabhängigkeit der $^1J_{N-H}$ -Kopplung ist in Abbildung 4.12 für das Tetrapeptid Ac-Gly-Gly-Ala-Ala-NH₂ gezeigt, welche sich ideal mit Gleichung 2.15 annähern lässt. Aus eben diesem Modell lassen sich die Differenzen der Gibbs Energie ΔG_{12}^0 sowie der molaren Volumenänderung ΔV_{12}^0 ermitteln (Tabelle 4.12).

Eine positive Korrelation mittlerer Stärke von $-0,46$ lässt sich für die Größe der ${}^1J_{N-H}$ -Kopplung mit der chemischen Verschiebung des Amidprotons bei Atmosphärendruck nachweisen (Tabelle 4.13). Ein solcher Zusammenhang wird von Sahakyan et al. vorausgesagt [Sah08], da aus der Hybrid Dichte Funktional Theorie beide Parameter linear von der Komponente des elektrischen Feldes parallel zur N-H-Bindung abhängig sind. In erster Linie ist der funktionelle Zusammenhang zwischen der ${}^1J_{N-H}$ -Kopplung und dem elektrischen Feld ähnlich zu dem, welcher bereits früher für die chemische Verschiebung hergeleitet wurde [Buc60]. Andererseits sollte die chemische Verschiebung des Stickstoffes nur wenig vom elektrischen Feld beeinflusst sein. Der Theorie folgend zeigt diese eine nur geringe, sogar negative Korrelation von $0,29$ mit der ${}^1J_{N-H}$ -Kopplung (Tabelle 4.13). Wenn die parallele Komponente des elektrischen Feldes hauptsächlich vom elektrischen Dipolmoment der Wasserstoffbrückenbindung mit Wasser her rührt, so würde das beobachtete Bild auch mit dem Ergebnis übereinstimmen, dass eben Wasserstoffbindungen sowohl zu einer stärker negativen ${}^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten, als auch zu einer Tieffeldverschiebung der 1H Resonanz führen, nicht aber zu einer signifikanten Änderung der chemischen Verschiebung des Stickstoffes [Xia13].

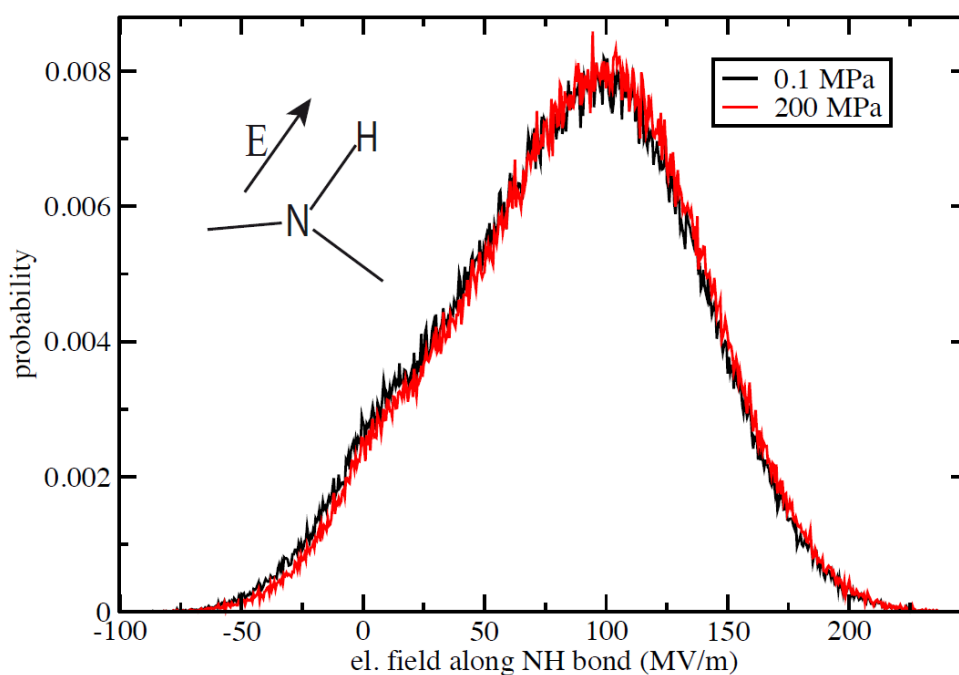


Abbildung 4.22: **MD-Simulation.** Verteilung des elektrischen Feldes, welches durch das umgebende Wasser erzeugt wird, parallel zur N-H-Bindung. Quelle Abbildung: [Koe14] .

Um den dargestellten Zusammenhang des Zweizustandsmodells mit Einflüssen des elektrischen Feldes auf das Molekül zu überprüfen, wurden MD-Simulationen (*Molecular Dynamics*) am Peptid Ac-Gly-Gly-Ile-Ala-NH₂ durchgeführt (Prof. Dr. D. Horinek, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Regensburg). Konkret wurde hier das vom umgebenden Wasser erzeugte elektrische Feld parallel zur N-H-Bindung der Amidgruppe von Ile₃ untersucht. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung dieses Feldes ist in Abbildung 4.22 zu sehen. Sie ist durch einen breiten Peak bei 100 V m^{-1} mit einer kleinen Schulter bei schwächerem Feld gekennzeichnet. Die zugehörige Differenz der freien Energie des Zustandes bei niedrigem Feld zwischen $0,1 \text{ MPa}$ und 200 MPa beträgt $-4,82 \text{ kJ mol}^{-1}$.

[Koe14]. Dieses Ergebnis liegt erstaunlich nahe am zugehörigen Wert aus Tabelle 4.12 von $-4,0 \pm 0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Richtung der dominanten Orientierung des elektrischen Feldes wäre hier mit der Situation zu assoziieren, dass das Dipolmoment des Wasser zu demjenigen der N-H-Bindung ausgerichtet ist. Durch diesen kollektiven Einfluss des Wassers auf das Molekül lassen sich die großen Änderungen des molaren Volumens (Tabelle 4.12) mit der umgebenden Hydrationshülle erklären.

Eine starke positive Korrelation von $-0,51$ zwischen der Größe der (negativen) $^1J_{N-H}$ -Kopplung J_1 in Zustand 1 (Tabelle 4.13) und der Änderung der Gibbs Energie zwischen den beiden Zuständen legt zudem den Schluss nahe, dass die Ursache der stärkeren Negativität der $^1J_{N-H}$ -Kopplung (die stärkere Wasserstoffbrückenbindung mit Wasser) zu einer stärkeren Populierung des Niederdruckzustandes 1 führt. Der lineare Anteil der Druckabhängigkeit B_1^N der ^{15}N chemischen Verschiebung ist mit $-0,50$ mit der Negativität der $^1J_{N-H}$ -Kopplung bei $0,1 \text{ MPa}$ so korreliert, dass stärker negative Werte der indirekten Spin-Spin-Kopplung mit einer stärkeren Druckantwort zusammenhängen. Mit dem nichtlinearen Anteil der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung B_2^N dagegen steht der Wert von $^1J_{N-H}$ bei 200 MPa in Verbindung ($-0,42$) (Tabelle 4.13). Das zeigt einen Zusammenhang zwischen einem kleinen Absolutwert der Kopplungskonstanten bei hohem Druck und einer stark asymptotisch verlaufenden Änderung der chemischen Verschiebung auf. Selbiges gilt für die Differenz der $^1J_{N-H}$ -Kopplungen zwischen $0,1 \text{ MPa}$ und 200 MPa . Die Neigung einer Aminosäure, beim Ausbilden eines β -Stranges beteiligt zu sein (P^β), korreliert mit kleinen Werten der Kopplungen bei $0,1 \text{ MPa}$ und 200 MPa ($0,61$ beziehungsweise $0,43$).

5 IN-VIVO-LIPID-HP-NMR-SPEKTROSKOPIE AN OOZYTEN

Kernspinresonanzspektroskopie an Flüssigkeiten unterscheidet sich aufgrund der Eigenbewegung der untersuchten Moleküle grundlegend von der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Die Grenze beider Teilbereiche veranschaulicht sich in der Spektroskopie an Lipiden. Hier sind nur mobile Lipide NMR-sichtbar, da es im Falle von zu geringer Eigenbewegung, aufgrund der molekularen Anisotropien, zu derart starken inhomogenen Linienverbreiterungen kommt, dass die Fläche der Resonanzlinie gänzlich im Rauschen der Grundlinie des Spektrums aufgeht. Diese Moleküle tragen somit nicht mehr zu definierten Linien im Spektrum bei, sind somit nicht mehr detektierbar. Der Grad der Mobilität und damit einhergehend der Sichtbarkeit in Kernspinresonanzspektroskopie-Experimenten ist nun stark sowohl von thermodynamischen Parametern wie Druck und Temperatur abhängig (Abbildung 5.1), aber auch von physiologischen Ursachen geprägt. Beispielsweise sind Struktur bildende Phospholipide der Zellmembran grundsätzlich weniger mobil als Triacylglycerole in Form kleiner Tröpfchen im Zytoplasma.

Dieser Zusammenhang zwischen Mobilität und Sichtbarkeit wurde bereits im Rahmen früherer Arbeiten am Beispiel von Lipoproteinen und Stammzellen gezeigt. Zum einen geschah die Mobilisierung von Lipiden in Blutserum auf dem Wege der Temperaturerhöhung [Bau11], was zu einer spezifischen Zunahme der Signalintensitäten führte. Zudem konnte

hier eine Verlängerung der Relaxationszeiten nachgewiesen werden. Andererseits wurde im Falle der Lipoproteine bereits eine Immobilisierung mittels Druckerhöhung nachgewiesen [Lob14]. Wie in diesen beiden vorangegangenen Untersuchungen, soll auch in vorliegender Arbeit das grundsätzliche Prinzip der Quantifizierung von Lipidsignalen mittels Volumenintegration über spezifische Resonanzen des dekomponierten Spektrums erfolgen. Diese Methode wurde von Ala-Korpela et al. im Jahre 1994 etabliert [Ala94].

Im Falle von lebenden Zellen sind beispielsweise die bereits erwähnten, Struktur bildenden Phospholipide, welche als Bestandteil von Zellmembranen weitestgehend immobilisiert sind, durch ein geringes, temperaturabhängiges Signalvolumen in NMR-spektroskopischen Experimenten gekennzeichnet. Diese Signale können aber aufgrund von Zerstörung von Geweben stark erhöht werden. Der Effekt ist hinreichend bekannt in nekrotischem Gewebe und tritt beispielsweise in Tumoren hohen Grades auf [Kue94]. Somit sind mobile Lipide in lebenden Zellen hinsichtlich der NMR zunehmend interessante Marker für Zellproliferation, Entzündungen, Malignität, Nekrose und Wachstum [Hakoo]. In humanen Stammzellen konnte bereits mittels NMR-Spektroskopie ein gesteigertes Signalvolumen bei fortschreitender Apoptose nachgewiesen werden [Ram11].

Ziel des Lipid-Projektes vorliegender Arbeit soll nun sein, die mobilitätsabhängige NMR-Sichtbarkeit von Lipiden mit der Spektroskopie an lebenden Zellen zu verbinden, somit Methoden zur in-vivo-Lipid-NMR-Spektroskopie zu etablieren. Aus oben genannten Gründen stellen hierzu allerdings Struktur bildende Lipide in gesunden Zellen kein geeignetes System dar. Zumal bezüglich der angestrebten Mobilisierungs-Immobilisierungs Untersuchungen hierbei eine gewisse Reversibilität der Effekte wünschenswert ist, um sie von komplexeren Vorgängen im Zellinneren zu separieren. Daher eignet sich im Begriff des Absterbens befindliches Gewebe hier ohnehin nicht. Es müssen also Zellen gewählt werden, welche sich zum einen durch einen hohen Anteil an mobilen Lipiden auszeichnen und zum anderen solche, welche über den Zeitraum des Experimentes ohne weitere Proliferation überleben können. Beide geforderten Eigenschaften finden sich in Oozyten vereint, welche wegen ihrer Überlebensfähigkeit und der im Zytoplasma befindlichen Lipid-Tröpfchen ein geeignetes System darstellen. Diese Lipid-Körper befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den Mitochondrien, was vermuten lässt, dass sie eine Energiequelle für den oxidativen Metabolismus darstellen. In Muskelzellen konnte bereits die Abnahme des dominanten Methylen-Signals bei lang andauernder aerober Anstrengung nachgewiesen werden, welches sich binnen 28 Stunden wieder regenerierte [Hakoo].

Mit der untersuchten, druckabhängigen Änderung der Signalvolumina $V(p)$ von Lipiden ist in erster Näherung wieder ein Zweizustandsmodell verbunden, mit den beiden Zuständen *sichtbar* und *unsichtbar*. Ziel des hier beschriebenen Projektes soll der Nachweis der druckinduzierten Immobilisierung mobiler Lipide sein. Als Nachweis soll hierzu hauptsächlich eine gruppenspezifische Druckantwort aus gesättigten und ungesättigten Bereichen der Fettsäureketten in Lipiden dienen. Es wird erwartet, dass sich aufgrund der strukturellen Besonderheiten der Doppelbindung die ungesättigten Bereiche als mobiler herausstellen, wohingegen sich die lang gestreckten, gesättigten Bereiche, aufgrund der Annäherung aneinander und der damit verbundenen Ausbildung stärkerer Van-der-Waals Kräfte, schneller immobilisieren lassen sollten.

Allerdings ergeben sich die hier beobachtbaren Erscheinungen vielmehr als Superposition komplexerer Vorgänge innerhalb der Fettsäureketten. Eine Analyse sowohl der Relaxationszeiten als auch der druckabhängigen Signalvolumina $V(p)$ soll die Mobilitätsverteilung der Lipide aufklären helfen. Wie bereits in Abschnitt 2.1.5 eingeführt, können die druckabhängigen Signalvolumina mittels eines Drei-Kompartimente-Modells [Bau11] beschrieben werden. Hierin wird ein Kompartiment S von stets sichtbaren Signalen angenommen, wel-

che sich als unabhängig von Druckänderungen auszeichnen. Eine weitere Fraktion U von Lipiden ist dauerhaft immobilisiert. Ihre Signale sind daher immer unsichtbar in Kernspinresonanzexperimenten. Die Lipide des dritten Kompartimentes P vollziehen innerhalb des untersuchten Druckbereiches einen Phasenübergang, weshalb ihre Signalvolumina $V(p)$ eine starke Druckabhängigkeit aufweisen. Allen Kompartimenten ist je eine Protonenkonzentration c zuzuordnen.

5.1 Materialien und Methoden

5.1.1 Oozyten von *Xenopus laevis*

Der Glatte Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) (Abbildung 5.1-a) ist in der Wissenschaftsgeschichte ein häufig anzutreffendes Tier. Sein Beiname Apothekerfrosch bezieht sich noch auf ehemals nur in Apotheken, eben mit Hilfe dieses Frosches, durchzuführenden Schwangerschaftstests [Gur96]. Nebenbei stellt er auch den ersten jemals geklonten Vertebraten

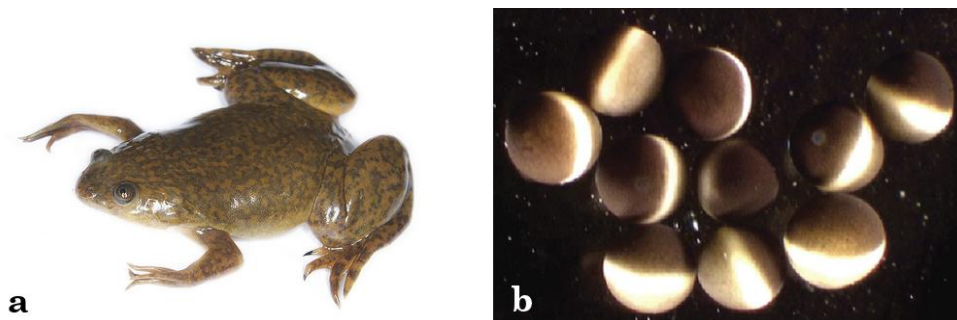


Abbildung 5.1: *Xenopus laevis* und Oozyten. a: Adulter, weiblicher Krallenfrosch (*X. laevis*) - Bildquelle: [Gra12]; b: Stadium VI Oozyten von *X. laevis*. Durchmesser ca. 1,2 mm; braun: vegetativer Pol; weiß: animaler Pol - Bildquelle: [Aza13]

dar [Gur62]. Speziell seine Oozyten (Abbildung 5.1-b) sind ein sehr beliebtes und seit Langem verwendetes Modellsystem in der biologischen Forschung zur Untersuchung von zellulären Komponenten, wie beispielsweise Ionenkanälen [Das87]. Ein weiteres Beispiel für ihre Verwendung findet sich im Bereich des *MRI* (*Magnetic Resonance Imaging*), einem orts aufgelösten NMR-Verfahren, welches auch in klinischen Magnetresonanztomographen Anwendung findet. Hier kann zwischen Zellkompartimenten innerhalb des vegetativen und des animalen Zytoplasmas, oder aber auch Strukturen des Zellkerns unterschieden werden [Seho1]. Somit sind sowohl die Frösche selbst, als auch deren Oozyten an vielen Instituten und Forschungseinrichtungen vorhanden.

Wegen der daraus resultierenden hohen Verfügbarkeit der Oozyten, sowie ihrer hohen Konzentration an Lipiden, wurden sie als lebendes Modellsystem zur In-vivo-Lipid-HP-NMR-Spektroskopie Untersuchung vorliegender Arbeit ausgewählt. Desweiteren weisen die

Eizellen eine relativ hohe Widerstandsfähigkeit gegen mechanische Beanspruchung auf. Sie sind obendrein voll ausgestattet mit allen metabolomisch benötigten Substraten und können daher lange Zeit ohne Aufnahme von Nährstoffen außerhalb des Tieres überleben [Wagoo].

Am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München (Prof. Dr. Hannelore Daniel) wird dem mittels 0,1 % 3-Aminobenzoessäure Ethyl Ester (*Sigma*, St. Louis, MO, USA) anästhesierten, auf Eis liegenden adulten Weibchen von *X. laevis* durch einen abdominalen Schnitt ein kleiner Teil des Ovars entnommen, in welchem sich Oozyten der Stadien V-VI befinden. Die Frösche werden nach der vierten und letzten Entnahme mit einer Überdosis des Anästhetikums getötet. Das Ovar wird nach der Entnahme 90 Minuten mit Kollagenase (2,5 mg ml⁻¹) behandelt, um die Oozyten grob darin zu lösen. Nach manueller Separation aus dem restlichen Ovar-Gewebe werden sie in Barth-Lösung (88 mM NaCl; 1 mM KCl; 0,8 mM MgSO₄; 0,4 mM CaCl₂; 0,3 mM Ca(NO₃)₂; 2,4 mM NaHCO₃; 10 mM HEPES; 100% H₂O; pH 7,5) über Nacht bei einer Temperatur von 290 K inkubiert.

Die am Folgetag in Regensburg ankommenden Oozyten werden für die Untersuchungen in vorliegender Arbeit in eine andere Puffer-Lösung überführt, um möglichst konstante Bedingungen für den Zeitraum der Experimente zu schaffen. Hierfür wird ND96-Lösung (96 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; 2,5 mM Na-Pyruvat; 1 mM DSS, 100% D₂O, pH 7,5) verwendet. Allerdings bleibt zu bemerken, dass sich auch nach mehrmaligem Spülen mit 100 % D₂O-ND96 noch Reste von H₂O in den Spektren extrazellulär nachweisen lassen. Dies begründet sich in einem Kompromiss des für den Austausch des leichten mit dem schweren Wasser lange genug Wartens einerseits und des möglichst zeitnahen Messens frischer Oozyten andererseits.

5.1.2 Membranspannung mittels Voltage Clamp

Seit den 1940ern werden ionische Ströme durch biologische Membrane mittels *Voltage Clamp* (zu deutsch in etwa "Spannungsklemme") gemessen [Col68]. Diese Methode wurde daraufhin zu einem Standardinstrument um Mechanismen der Elektrogenese und Signalweiterleitung zu untersuchen. Heutzutage ist die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp eine sowohl in der Molekularbiologie, als auch in der Physiologie etablierte Methode, zur Bestimmung der Vitalität von lebenden Zellen [Poloi]. Hierbei befindet sich eine einzelne Zelle in der leitfähigen Puffer-Lösung ND96 (Zusammensetzung siehe Abschnitt 5.2.1), welche die erste Elektrode darstellt. Die Oozyte wird mittels einer sehr feinen Glaspipette punktiert (Abbildung 5.2), wodurch die Innenseite der Membran kontaktiert wird. Die Pipette ist ihrerseits leitend mit einer 1 molaren KCl-Lösung gefüllt und dient somit als zweite Elektrode. Sie besitzt einen elektrischen Widerstand von 1 MΩ. Über eine Mess-Elektronik (Turbo TEC-o3X-LV und TEC-CUR-LV, *NPI Electronic Instruments for Life Sciences*, Tamm, Deutschland) lässt sich somit das elektrische Potential zwischen dem Zellinneren und dem Bad bestimmen, also das Membranpotential der Zelle messen. Lebende Zellen sind in der Lage ein definiertes Membranpotential aufrecht zu erhalten und dieses mittels molekularer Ionenkanäle und Pumpmechanismen zu regulieren. Stirbt die Zelle ab, so ist sie zu keinerlei Metabolismus mehr fähig. Dies führt zu einem Versagen der Pumpmechanismen, was wiederum einen verschwindenden Ionengradienten zwischen Zellinnerem und -äußeren zur Folge hat. Das Membranpotential bricht zusammen, was somit einen sicheren Indikator für den eingetretenen Zelltod darstellt.

5.1.3 Hochdruck NMR-Spektroskopie an Oozyten

Alle NMR-spektroskopischen Messungen dieses Kapitels wurden an einem *Bruker Avance* 500-MHz-NMR-Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (TXI) mit statischer, manuell betriebener Druckbank durchgeführt.

Die Probenzusammensetzung war stets 100 Oozyten in ND96 (siehe Abschnitt 5.2.1), 100 % D₂O bei pH 7,5. Die Verwendung von 100 % D₂O ergab sich aufgrund der Nähe des Signals der Methingruppen zur H₂O Resonanz.

Die Messungen der druckabhängigen Signalintensitäten erfolgte mittels eines einfachen ¹H-Pulsprogrammes (*Bruker* Nomenklatur: *zg*), welches nur einen einzelnen 90°-Impuls auf Protonen enthält. Eine Wasserunterdrückung war aufgrund der Verwendung von D₂O nicht notwendig. Diese Spektren enthalten 32k Datenpunkte und wurden mit 32 Wiederholungen bei einer Temperatur von 293 K aufgenommen.

Für die Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit T_1 wurde eine *Inversion-Recovery*-Pulssequenz benutzt (*Bruker* Nomenklatur: *t1r*). Hierbei wird mittels eines 180°-Impulses die Magnetisierung M aus dem thermischen Gleichgewicht in (-z)-Richtung gebracht. Nach einer variablen Wartezeit τ reduziert sich diese aufgrund longitudinaler Relaxation zu $M_z(\tau)$, welche mittels eines 90°-Impulses in eine dazu proportionale, sowie detektierbare Quermagnetisierung überführt wird [Hau89]. Für sehr kurze τ ergibt sich somit ein negatives Signal, für beliebig große ein maximal Positives (siehe hierzu auch Abbildung 5.9). Aus dem exponentiellen Verlauf der Zeitabhängigkeit lässt sich mittels Gleichung 2.26 T_1 ermitteln. Konkret wurden hierzu in vorliegender Arbeit Messungen für $\tau = 0,1$ s bis $\tau = 1,1$ s in Intervallen von 0,1 s und zusätzlich für $\tau = 2,5$ s durchgeführt, welche je 32k Datenpunkte enthalten und mit acht Wiederholungen bei einer Temperatur von 293 K aufgenommen wurden.

Um die transversale Relaxationszeit T_2 zu bestimmen, wurde eine *CPMG*-Pulssequenz (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) verwendet (*Bruker* Nomenklatur: *cpmg*). Diese Pulsfolge rephasiert mittels eines 180°-Impulses nach einer Wartezeit τ die dephasierte Quermagnetisierung zu einem Spin-Echo, welches aber aufgrund irreversibler Spin-Spin-Wechselwirkungen von geringer Amplitude ist als das ursprüngliche Signal [Hau89]. Nach Applikation vieler 180°-Impulse lässt sich aus der exponentiell abfallenden Envelope der Echo-Amplituden mittels Gleichung 2.27 die Zeitkonstante T_2 ermitteln. Hierbei wurden wiederum pro Experiment 32k Datenpunkte mit vier Wiederholungen bei einer Temperatur von 293 K aufgenommen. Die Wartezeiten begannen hier bei $\tau = 1$ ms und führten sich von $\tau = 5$ ms bis $\tau = 35$ ms in Intervallen von 5 ms fort.

Kernspinresonanzspektroskopie an Zellen im Allgemeinen bringt gewisse Schwierigkeiten hinsichtlich der Auflösung der Spektren im Vergleich zu Experimenten an reinen Lösungen mit sich. Die zwei bedeutendsten sind zum einen die starke Inhomogenität der Probe, resultierend aus Pufferlösung, Zellmembran und Zellinnerem und den damit verbundenen Unterschieden in der magnetischen Suszeptibilität [Ram11]. Diese führen zu gravierenden Verzerrungen der Feldlinien und damit verbunden zu einer ortsabhängigen Amplitude des magnetischen Feldes. Der hier beschriebene Effekt ist durch die Shim-Spulen des Spektrometers nur sehr bedingt kompensierbar. Desweiteren sind die zu beobachtenden Moleküle in lebenden Zellen durch Kompartimente im Zytoplasma in ihren Freiheitsgraden hinsichtlich Rotation und Translation stark eingeschränkt. Dies reduziert den Vorteil der Lösungs-NMR-Spektroskopie gegenüber der Festkörper-NMR-Spektroskopie, welcher gerade auf der Aufhebung molekularer Anisotropien mittels schneller Eigenbewegungen der Mole-

küle beruht. Dadurch waren in den hier durchgeführten Experimenten starke Linienverbreiterungen und damit einhergehend ein Überlapp der Linien zu erwarten.

Um dennoch Aussagen über einzelne Methin-, Methylen- und Methyl-Gruppen der Lipide treffen zu können, bedarf es einer mathematischen Dekomposition der Spektren. Die mittels *Bruker Topspin 3.2* prozessierten Spektren mussten zur weiteren Analyse nachbehandelt werden. Das Programm *Dmfit (CEMHTI Conditions Extremes et Materiaux: Haute Temperature et Irradiation)*, Orleans, Frankreich) erlaubt das Modellieren eines Spektrums als Envelope benutzerdefinierter Gauss-Lorentz-Linien. Alle Parameter des simulierten Spektrums, wie Position, Breite und Höhe der Linien, aber auch das Verhältnis ihres Gauss- zu Lorentz-Charakters werden anschließend iterativ angepasst, um den Abstand ihrer Envelope zum realen Spektrum zu minimieren. Somit erhält man die Möglichkeit, über einzelne Resonanzlinien zu integrieren und dadurch, trotz des starken Überlapps im realen Spektrum, die Signalintensität zu bestimmen. Sowohl für die Relaxationszeiten als auch für die druckabhängige Intensität der Signale war die Kenntnis ihrer genauen Volumina unabdingbar.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Druckabhängigkeit der Membranspannung

Um eventuelle Irreversibilitäten der NMR-spektroskopischen Resultate auf metabolische Aktivitäten der lebenden Zelle zurückführen zu können, war die Kenntnis des vitalen Druckbereichs der verwendeten Oozyten unabdingbar. Aus Untersuchungen der Membranspannung mittels Voltage Clamp Messungen sollte der maximal benutzbare Druckwert ermittelt werden.

Hierzu wurden jeweils Gruppen von 10 Oozyten 30 Minuten einem statischen Druck ausgesetzt und unmittelbar im Anschluss deren Membranpotential gemessen (Abbildung 5.2). Um die stark schwankenden Ergebnisse der Untersuchungen an diesen lebenden Systemen zu kompensieren, wurde über die Messung der 10 Zellen gemittelt. Auf Abbildung 5.3 ist der grafische Verlauf der druckabhängigen Vitalität der Oozyten von 0,1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa zu sehen. Es zeigte sich, dass bei einem Druck oberhalb von 120 MPa der Betrag des Membranpotentials signifikant abnahm. Somit ergab sich im Falle der Oozyten von *X. laevis* für die In-vivo-HP-NMR-spektroskopischen Untersuchungen an Lipiden eine Drucklimitierung von 120 MPa.

Betrachtet man in Abbildung 5.3 lediglich den Bereich von 0,1 MPa bis 100 MPa, so deu-

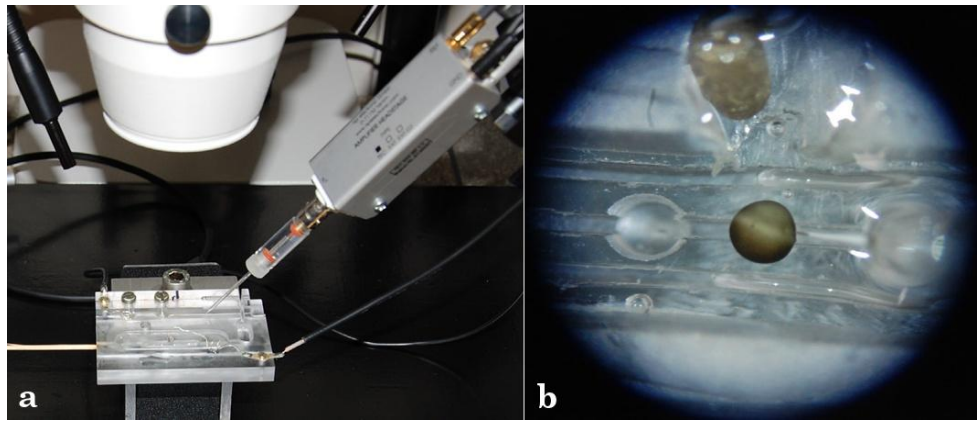


Abbildung 5.2: **Zwei-Elektroden-Voltage Clamp.** a: Aufbau mit beweglicher Glaselektrode und dem kontaktierten Lösungs-Bad. b: kontaktierte Oozyte im Blick durch das Mikroskop: die leichte Delle in der rechten Hälfte der Oozyte ist die Einstichstelle der Pipette.

tet sich hier eine leichte betragliche Erhöhung des Membranpotentials im Intervall von 0,1 MPa bis 50 MPa an, welche bis 100 MPa wieder zu verschwinden scheint. Dies könnte zum einen auf eine aktive, physiologische Antwort der Zellmembran auf den stressinduzierenden Druck zurückzuführen sein. Zum anderen aber besteht auch die Möglichkeit, dass dieser Effekt auf molekularer Ebene in einer druckinduzierten, strukturellen Veränderung sowohl

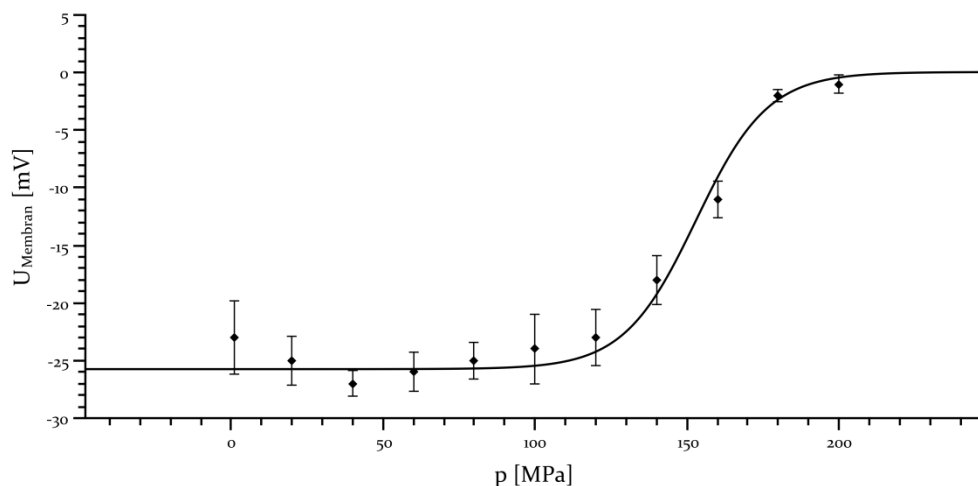


Abbildung 5.3: **Druckabhängiges Membranpotential von Oozyten von *X. laevis*.** Jeweils 10 Zellen wurden für 30 Minuten statischen Drücken ausgesetzt und ihre Membranspannung im Anschluss gemessen. Die Messung erfolgte innerhalb weiterer 30 Minuten nach der Druckbehandlung. Datenpunkte: Mittelwerte der Spannung. Fehlergrenzen: Standardabweichung in der jeweiligen Gruppe. Durchgezogene Linie: sigmoidaler Fit der beiden Zustände "lebend" und "tot".

der Ionenkanalproteine, als auch der Zellmembran selbst begründet liegt. Da allerdings ein solcher Verlauf der Membranspannung bei nachfolgenden Experimenten nicht zweifelsfrei

reproduziert werden konnte, ist die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines reinen Artefakts nicht gänzlich auszuschließen.

Ein weiterer Hinweis auf eine aktive Antwort der Oozyten von *X. laevis* auf Druck findet sich bei Wilhelm [Wil12]. Hier konnte auf eine analoge Art und Weise der zeitliche Verlauf der Membranspannung aufgezeigt werden. Dazu wurden die Oozyten einem Druck von 50 MPa ausgesetzt und in Gruppen ihr Membranpotential zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Eine halbe Stunde nach der Behandlung wiesen die Zellen in Relation zur Kontrollgruppe eine betragsmäßig um 9,8 mV reduzierte Spannung auf, welche sich eine Stunde später wieder normalisierte. Weitere zwei Stunden später hatte sich der Betrag der Membranspannung bereits um 10,9 mV erhöht. Hieraus ließe sich nach einem anfänglichen, stressinduzierten Einbrechen des Potentials auf eine Festigung der Zellmembran innerhalb von 3,5 h nach der Druckbehandlung schließen.

5.2.2 In-vivo-Lipid-HP-NMR-Spektroskopie

Aus Voruntersuchungen an Homogenisaten von Oozyten war bereits bekannt, dass die Signalvolumina analog zu den Lipoproteinen sowohl temperatur- als auch druckabhängig sind (Abbildung 5.4). Eine Steigende Temperatur führte hier ebenso wie ein sinkender Druck zu größerer Signalintensität. Um diese Effekte zu quantifizieren und auf lebende Zellen zu übertragen, wurden eine Reihe von Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie-Experimenten durchgeführt.

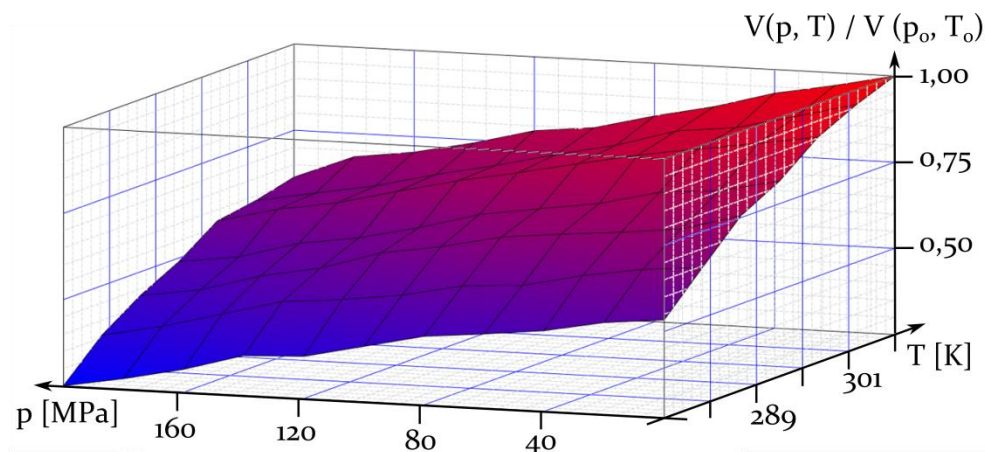


Abbildung 5.4: **Druck- und Temperaturabhängigkeit von $V(p, T)$.** Das isolierte, dominante Methylensignalvolumen $V(p, T)$ in einem Homogenisat aus Oozyten von *X. laevis* bei verschiedenen Drücken und Temperaturen.

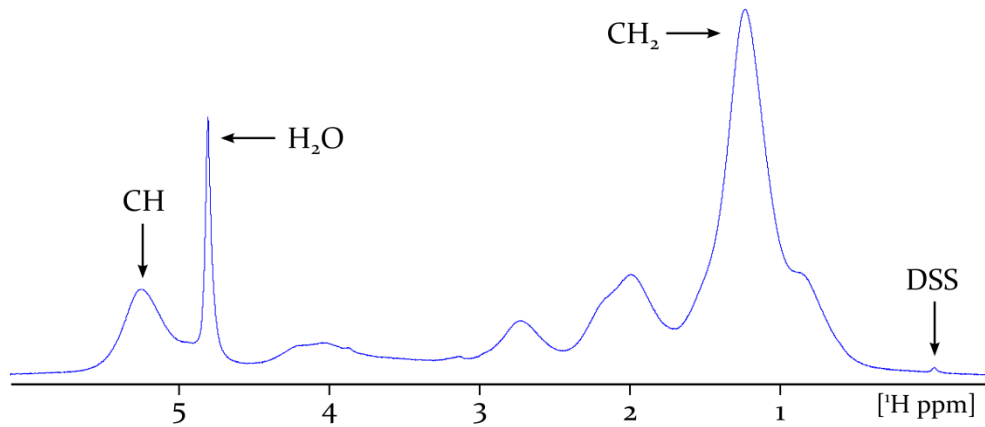


Abbildung 5.5: **Protonen Spektrum der Lipide in Oozyten von *X. laevis*.** ^1H -Spektrum von 100 lebenden Oozyten bei 500 MHz Resonanzfrequenz, pH 7,5, $T = 293\text{ K}$; ND96-Lösung mit 100 % D_2O . Nur das Signal der Methingruppe (CH) ist als separierte Linie zu sehen; das Signal der Methylengruppe (CH_2) ist aufgrund der hohen Intensität auszumachen; die restlichen Lipidsignale überlappen teilweise stark. Die extrazelluläre H_2O -Resonanz resultiert aus mit D_2O ausgetauschtem Restwasser, welches sich zu Beginn noch innerhalb der Zellen befand.

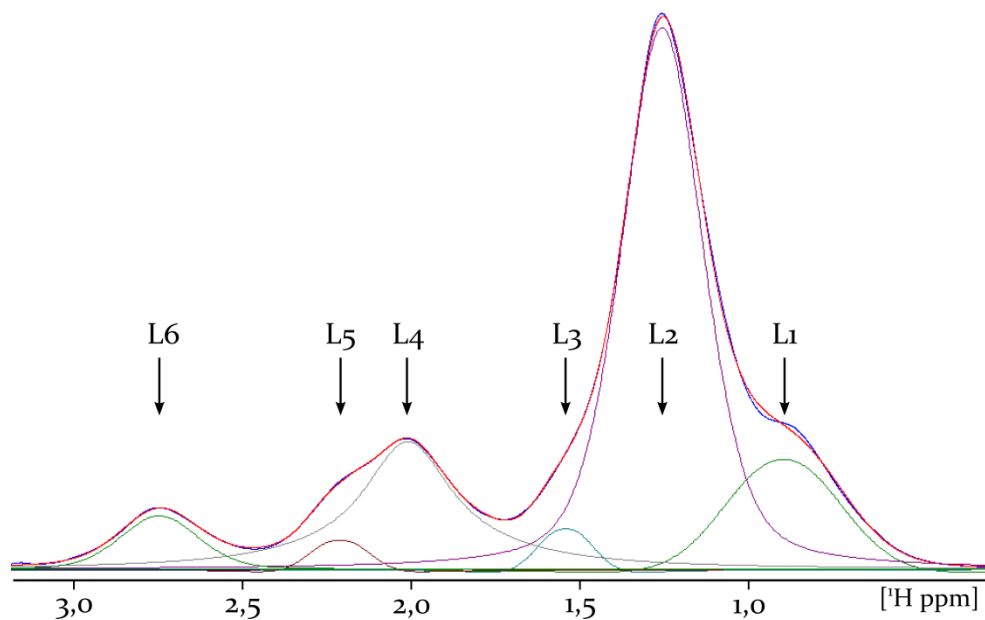


Abbildung 5.6: **Dekomposition des Protonen Spektrums.** Sichtbarmachen der Resonanzen von Lipiden in Oozyten von *X. laevis* mittels Dekomposition des Spektrums. Nur im Bereich der Resonanz L_1 lässt sich eine leichte Diskrepanz zwischen der modellierten Envelope (rot) der optimierten Einzellinien und dem realen Spektrum (blau) erkennen.

5.2.2.1 Zuordnung der Lipidsignale

Die in Abschnitt 5.2.3 bereits erwähnte, starke Inhomogenität bezüglich der magnetischen Suszeptibilität der verwendeten Zell-Proben und die intrazellulär eingeschränkten Freiheitsgrade der Moleküle führten zu einem starken Überlapp der Resonanzlinien (Abbildung 5.5). Lediglich die Methingruppe bei 5,28 ppm war als separierte Resonanzlinie zu erkennen. Das Methylenignal bei 1,25 ppm ließ sich wegen seiner dominierenden Intensität ebenfalls ausmachen. Nach der mathematischen Dekomposition der Spektren war eine Zuordnung der einzelnen Resonanzen zu spezifischen CH_x -Gruppen innerhalb der Lipide möglich (Abbildung 5.6). Die Lipidsignale L_1 - L_7 werden wie folgt einzelnen Methylen-, Methyl- sowie Methin-Gruppen nach [Leeo6] zugeordnet:

	Signalursprung	δ [ppm]	Linienbreite [Hz]
L_1	$-\text{CH}_3$	0,92	201
L_2	$(-\text{CH}_2-)_n$	1,28	142
L_3	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}$	1,57	98
L_4	$\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$	2,04	171
L_5	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}$	2,24	97
L_6	$=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$	2,77	138
L_7	$-\text{CH}=\text{CH}-$	5,40	142

Tabelle 5.1: Zuordnung der Lipidsignale L_1 - L_7 nach [Leeo6]. Die chemische Verschiebung und die Linienbreite ergeben sich ebenfalls aus der mathematischen Dekomposition des Spektrums mit dem Programm Dmfit. Der Fehler der chemischen Verschiebung kann mit 0,08 ppm angegeben werden, derjenige der Linienbreite mit 6 Hz.

L_1 setzt sich aus verschiedenen Methylgruppen von Lipiden innerhalb kleiner Fetttröpfchen des Zytoplasmas der Oozyten zusammen. Eine Trennung in freie Fettsäuren, Triacylglycerole oder Cholesterin ist aufgrund der Breite von 201 Hz der dekomponierten L_1 -Resonanz nicht möglich. L_2 repräsentiert die sich häufig wiederholende Methylengruppe gesättigter Fettsäuren. Bei L_3 und L_5 handelt es sich dagegen um CH_2 -Gruppen nahe an der Kopfgruppe einer Fettsäurekette. L_4 und L_6 sind ebenso Methylengruppen, welche aber in der Nachbarschaft einer Doppelbindung ungesättigter Fettsäuren zu finden sind. Die beiden Methingruppen der Doppelbindung selbst sind durch L_7 repräsentiert. Resonanzen von Cholin und des Glycerol-Rückgrates von Triacylglycerolen liegen dagegen im Bereich von 3 ppm bis 4,5 ppm (Abbildung 5.5) und sind hier somit keinem der genannten Lipidsignale zuzuordnen. Am Wert der Linienbreite ist die starke inhomogene Verbreiterung auszumachen

5.2.2.2 Druckabhängigkeit der Signalvolumina

Eine Druckerhöhung führte insgesamt zu einer Reduktion der gesamten Signalintensität des Spektrums. Um die relative Änderung der druckabhängigen Signalvolumina $V(p)$ zu ermitteln, wurde das Integral eines jeden Lipidsignals auf den jeweiligen Startwert $V(p_o)$ bei

0,1 MPa normiert (Abbildung 5.7). Somit ergaben sich vergleichbare, druckabhängige Intensitätsänderungen. Mittels Gleichung 2.25 konnten aus diesem Verlauf Änderungen der thermodynamischen Parameter ΔG° (freie Energie), ΔV° (molares Volumen) und $\Delta\beta'$ (molarer Kompressibilitätsfaktor) bestimmt werden. Zudem ermöglichte der Fit mit Gleichung

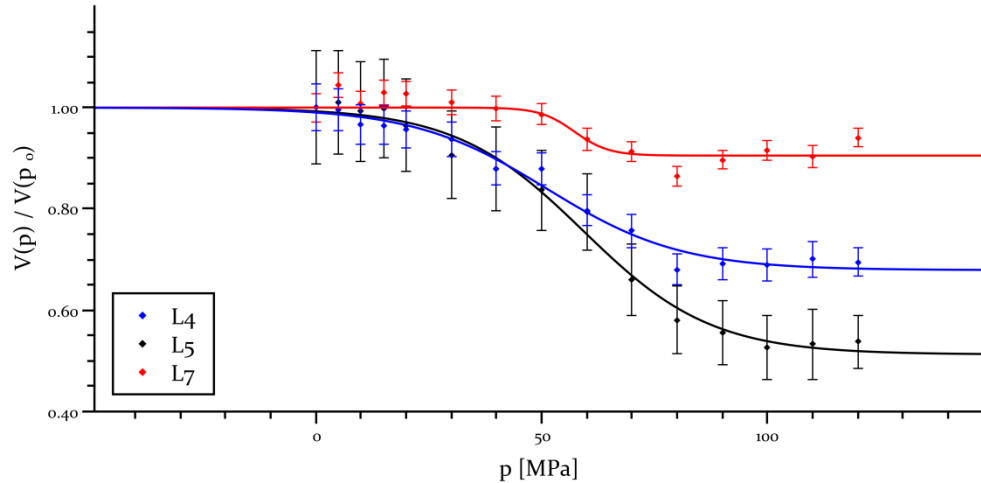


Abbildung 5.7: **Druckabhängigkeit der Lipidsignalvolumina.** Integrale der Signale L4, L5 und L7 normiert auf den Startwert bei 0,1 MPa. Probenzusammensetzung und Messbedingungen wie in Abbildung 5.5. Dekomposition des Spektrums und Integration der Signalvolumina mit Dmfit; Fehlerangaben beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. Durchgezogene Linien: Fit der Daten mit Gleichung 2.25 mit Parametern aus Tabelle 5.2. Die Determinationskoeffizienten R^2 der Fits sind 0,98 (blau), 0,99 (schwarz) und 0,85 (rot).

	$\frac{V(200 \text{ MPa})}{V(0,1 \text{ MPa})}$	ΔG° [kJ mol ⁻¹]	ΔV° [ml mol ⁻¹]	$\Delta\beta'$ [MPa ⁻¹]	$\frac{c_p}{c_s}$
L1	0,78 ± 0,02	4,6 ± 0,7	-22 ± 13	4,0 ± 0,5	0,32 ± 0,01
L2	0,72 ± 0,01	5,5 ± 0,5	-68 ± 5	1,0 ± 0,1	0,41 ± 0,02
L3	0,63 ± 0,07	4,3 ± 0,5	-13 ± 5	2,5 ± 0,1	0,73 ± 0,02
L4	0,69 ± 0,03	4,5 ± 0,6	-53 ± 7	1,9 ± 0,2	0,53 ± 0,02
L5	0,54 ± 0,05	5,6 ± 0,6	-39 ± 8	2,2 ± 0,1	0,99 ± 0,04
L6	0,79 ± 0,02	6,2 ± 1,0	-4 ± 16	5,3 ± 0,4	0,29 ± 0,01
L7	0,94 ± 0,02	10,2 ± 1,8	-6 ± 30	6,0 ± 1,2	0,11 ± 0,01
Mittel ^a	0,73 (0,12)	5,8 (1,9)	-29 (23)	3,3 (1,7)	0,48 (0,28)

Tabelle 5.2: **Druckabhängigkeit der normierten Lipidsignalvolumina in Oozyten von *X. laevis*.** Probenzusammensetzung und Bedingungen wie in Abbildung 5.5. Parameter ΔG° , ΔV° , $\Delta\beta'$ und c_p/c_s ermittelt mit Gleichung 2.25; angegebene Fehler entsprechen einem Konfidenzniveau von 95 %. ^aBerechnete Mittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern.

2.25 das Ermitteln des Konzentrationsverhältnisses von Kompartiment *P* zu Kompartiment *S*, also von den in den Phasenübergang involvierten Lipiden zu den stets sichtbaren (Tabelle 5.2).

Es zeigte sich, dass *L*₇ mit 6 ± 2 % die kleinste relative Intensitätsänderung zwischen 0,1 MPa und 100 MPa aufwies, gefolgt von der Methylengruppe zwischen zwei Doppelbindungen *L*₆ mit 21 ± 2 % und der Methylgruppe *L*₁ mit 22 ± 2 %. Die sich wiederholende Methylengruppe *L*₂ besaß mit 28 ± 1 % eine Intensitätsreduktion nahe am Mittelwert von 27 %. *L*₄, die Methylengruppe nahe an einer Doppelbindung, wies mit 31 ± 3 % einen leicht überdurchschnittlichen Rückgang der Intensität auf. Bei *L*₃ machte sich, mit einer Abnahme um 37 ± 7 %, bereits der Einfluss der Kopfgruppe bemerkbar. Den stärksten Einbruch des Signalvolumens konnte man bei *L*₅ verzeichnen. Diese unmittelbar auf die Kopfgruppe folgende Methylengruppe verlor 46 ± 5 % ihres ursprünglichen Signales (Tabelle 5.2).

Die Analyse der mit Gleichung 2.25 ermittelten thermodynamischen Parameter (Tabelle 5.2) ergab eine mittlere Änderung der freien Energie von $5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ mit einer Standardabweichung von $1,9 \text{ kJ mol}^{-1}$. Einzig *L*₇ wies mit $10,2 \pm 1,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ einen überdurchschnittlichen

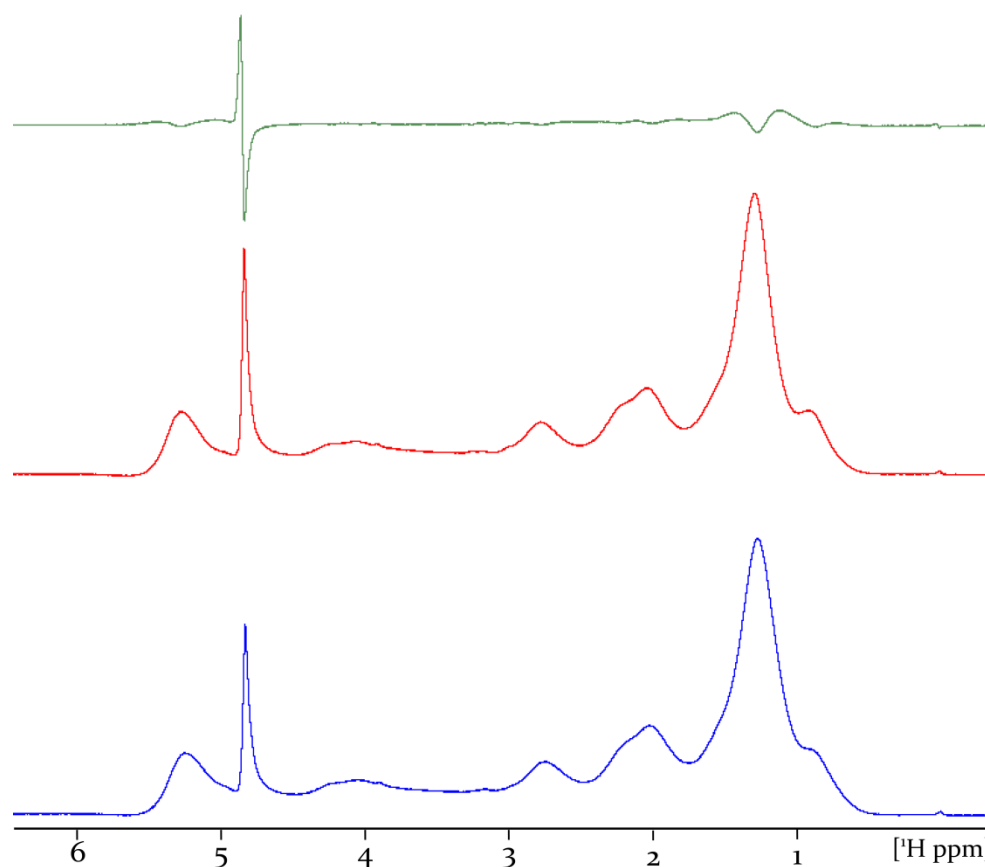


Abbildung 5.8: **Reversibilität der druckabhängigen Intensität.** Protonenspektrum von Lipiden in Oozyten von *X. laevis* bei 0,1 MPa: zu Beginn der Messreihe (blau), nach Erreichen von 120 MPa (rot); Differenz beider Spektren (grün). Nur im Bereich des dominanten Methylensignals verschwindet die Differenz nicht vollständig.

Wert auf. Die übrigen Lipidsignale lagen allesamt nahe am Mittelwert. Den hier größten Wert von ΔG° besaß *L6* mit $6,2 \pm 1,0 \text{ kJ mol}^{-1}$, den insgesamt kleinsten Wert nahm *L3* mit $4,3 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ an.

Bei der Änderung des molaren Volumens ΔV° zeigte *L2* mit $-68 \pm 5 \text{ ml mol}^{-1}$ den betragsmäßig höchsten Wert, aber auch *L4* lag mit $-53 \pm 7 \text{ ml mol}^{-1}$ noch deutlich über dem Durchschnitt von -29 ml mol^{-1} . *L1*, *L5* und *L7* konnten wegen des relativ großen Fehlers hier nicht eindeutig eingeordnet werden, es ist bei ihnen eine durchschnittliche Volumenänderung anzunehmen. *L3* und *L6* wiesen dagegen wieder einen deutlich unterdurchschnittlichen Wert auf. (Tabelle 5.2).

Die Änderungen des Kompressibilitätsfaktors ergaben einen Mittelwert von $3,3 \text{ MPa}^{-1}$ bei einer Standardabweichung von $1,7 \text{ MPa}^{-1}$. *L7* besaß mit $6,0 \pm 1,2 \text{ MPa}^{-1}$ die größte Änderung, gefolgt von *L6* mit $5,3 \pm 0,4 \text{ MPa}^{-1}$ und *L1* mit $4,0 \pm 0,5 \text{ MPa}^{-1}$. *L2* wies hier mit $1,0 \pm 0,1 \text{ MPa}^{-1}$ einen kleinsten Wert auf.

Bei einem durchschnittlichen Konzentrationsverhältnis von 0,48 von in den Phasenübergang involvierten Lipiden zu den stets sichtbaren, errechnete sich die Standardabweichung von Signal zu Signal zu 0,28. Somit war der Anteil der druckunabhängigen Lipidsignale höchst unterschiedlich. Bei den Methingruppen (*L7*) war der geringste Anteil der druckabhängigen Signale zu verzeichnen ($0,11 \pm 0,01$). Die sichtbaren Methylengruppen nahe an der Kopfgruppe (*L5*) vollzogen dagegen zur Hälfte ($0,99 \pm 0,04$) einen Phasenübergang.

Die druckinduzierten Intensitätsänderungen waren alle reversibel. Die Differenzbildung zweier Spektren vor und nach Druckbehandlung ergab lediglich im Bereich von *L2* einen lokal von Null abweichenden Wert (Abbildung 5.8 - grün). Diese Schwankung war lediglich auf eine leicht schmalere Linie bei selber Fläche nach der Druckbehandlung (rot) zurückzuführen.

5.2.2.3 Druckabhängigkeit der longitudinalen Relaxation

Der Mittelwert der Spin-Gitter-Relaxationszeiten aller Lipidsignale, welche im *Inversion Recovery* Experiment bestimmt wurden (Abbildung 5.9), lag bei 0,653 s. Die Protonen der Methingruppen an der Doppelbindung (*L7*) besaßen mit $1,035 \pm 0,007 \text{ s}$ die größte Relaxationszeit, gefolgt von der Methylgruppe *L1* mit $0,801 \pm 0,007 \text{ s}$ (Tabelle 5.3). Bei den übrigen Signalen wies *L6* mit $0,624 \pm 0,011 \text{ s}$ eine erhöhte Relaxationszeit im Vergleich zu den übrigen Methylengruppen auf. Den kleinsten Wert wies *L3* mit $0,509 \pm 0,006 \text{ s}$ auf.

Betrachtete man die Druckabhängigkeit der longitudinalen Relaxationszeit, so zeigte einerseits *L7* mit $-0,290 \pm 0,011 \text{ s } 100\text{MPa}^{-1}$ die größte Änderung, andererseits besaßen die Methingruppen aber auch bei 100 MPa noch die längste T_1 -Zeit mit $0,745 \pm 0,029 \text{ s}$ (Tabelle 5.3) (Abbildung 5.10). Selbiges galt für die Methylgruppe (*L1*): sie besaß mit $-0,174 \pm 0,012 \text{ s } 100\text{MPa}^{-1}$ die zweit größte Änderung, aber auch mit $0,627 \pm 0,042 \text{ s}$ wiederum die zweit längste T_1 -Zeit bei hohem Druck. Bei den Methylengruppen war interessanter Weise, bis auf Ausnahme von *L6*, eine nahezu konstante Abnahme der Relaxationszeit von etwa $-0,05 \text{ s } 100\text{MPa}^{-1}$ messbar. Dieser Effekt führte für diese Signale zu einer unveränderten Reihenfolge der Länge der T_1 -Zeiten bei 100 MPa. Einzig des Methylsignal zwischen zwei Doppelbindungen (*L6*) zeigte einen relativ großen Einbruch von $-0,143 \pm 0,020 \text{ s } 100\text{MPa}^{-1}$. Dies führte mit einer Hochdruck- T_1 -Zeit von $0,482 \pm 0,067 \text{ s}$ zu einer Annäherung an den Wert des *L2*-Signals von $0,487 \pm 0,084 \text{ s}$. Somit wiesen lediglich die beiden Signale nahe der Kopfgruppe (*L3* und *L5*) eine noch kürzere T_1 -Zeit bei 100 MPa auf (Tabelle 5.3). Dieser gruppenspezifische

sche Unterschied der Druckabhängigkeit der longitudinalen Relaxationszeit verdeutlicht sich anschaulich in Abbildung 5.10 durch die Normierung auf den Startwert bei 0,1 MPa.

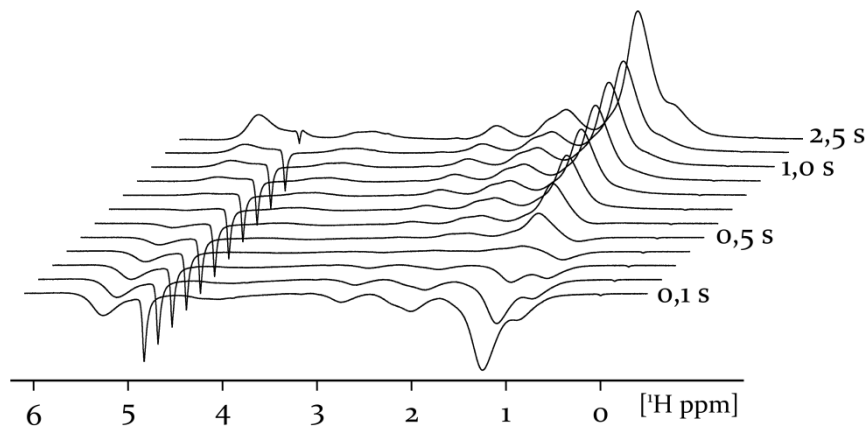


Abbildung 5.9: **Inversion Recovery Experiment an Lipidgruppen in Oozyten von *X. laevis*.** Die gezeigte Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten erfolgte bei einer Temperatur von 293 K und einem Druck von 0,1 MPa. Qualitativ offenbart sich die unterschiedliche Zeitkonstante in einem voneinander abweichenden Nulldurchgang der Intensität: das Wassersignal zeigt hier selbst bei 2,5 s noch eine Inversion.

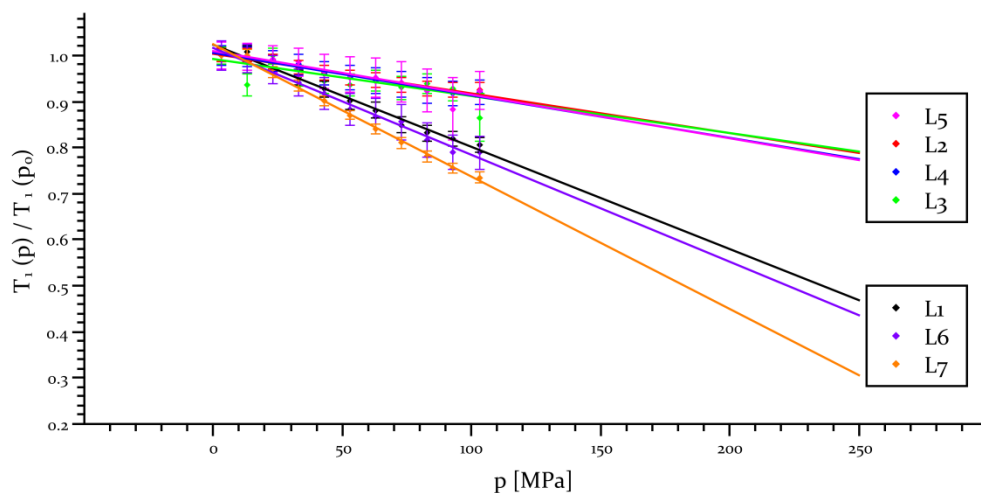


Abbildung 5.10: **Druckabhängige normierte Relaxationszeiten $T_1(p)$.** Die Relaxationszeiten der Lipidsignale L1-L7 in Oozyten von *X. laevis* sind normiert auf den Startwert $T_1(p_0=0,1 \text{ MPa})$. Es verdeutlicht sich ein gruppenspezifisches Verhalten: Die mobilen Bereiche L1, L6 und L7 weisen einen relativ starken Einbruch auf, ihr Absolutwert liegt allerdings stets über dem der restlichen Signale (siehe Tabelle 5.3). Durchgezogene Linien: linearer Fit der Daten.

5.2.2.4 Druckabhängigkeit der transversalen Relaxation

Die Methylgruppe L_1 zeigte die längste T_2 -Zeit mit $0,064 \pm 0,003$ s (Abbildung 5.11). Die hochmobilen Methingruppen der Doppelbindung (L_7) wiesen mit $0,033 \pm 0,001$ s eine der kürzesten Zeiten auf (Tabelle 5.3). Dagegen zeichnete sich das Signal L_6 zwischen zwei Doppelbindungen mit der zweit längsten T_2 -Zeit von $0,052 \pm 0,003$ s aus, gefolgt von L_2 mit

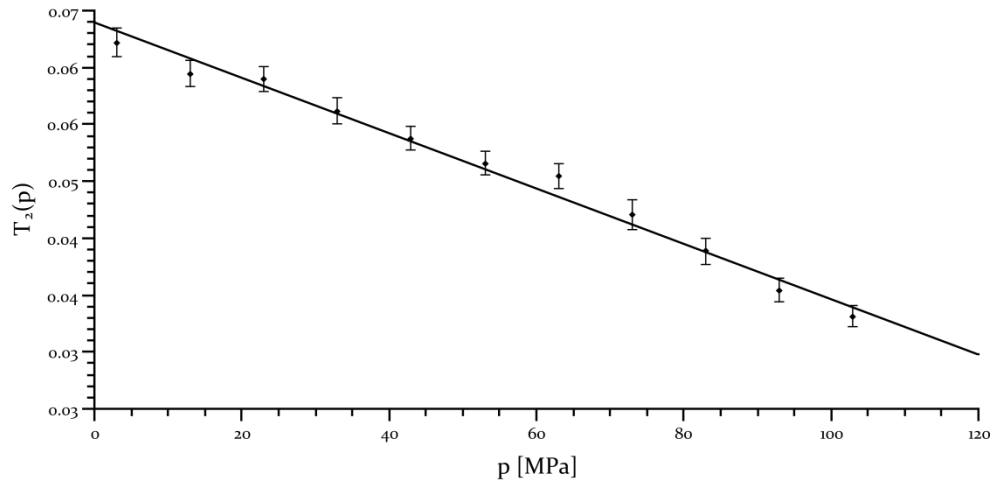


Abbildung 5.11: **Druckabhängige Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 des Lipidsignals L_1 .** Gemessen in Oozyten von *X. laevis* bei einer Temperatur von 293 K mit einem CPMG-Experiment. Dekomposition des ^1H -NMR-Spektrums sowie Integration der Signalvolumina mit Dmfit. Angegebene Fehler entsprechen einem Konfidenzniveau von 95 %. Durchgezogene Linie: linearer Fit.

	T_1° [s]	δT_1 [s 100MPa $^{-1}$]	T_2° [s]	δT_2 [s 100MPa $^{-1}$]
L1	0,801 \pm 0,007	-0,174 \pm 0,012	0,064 \pm 0,003	-0,025 \pm 0,004
L2	0,532 \pm 0,005	-0,046 \pm 0,008	0,049 \pm 0,001	-0,025 \pm 0,001
L3	0,509 \pm 0,006	-0,041 \pm 0,012	0,033 \pm 0,001	-0,016 \pm 0,002
L4	0,551 \pm 0,007	-0,051 \pm 0,013	0,024 \pm 0,001	-0,007 \pm 0,001
L5	0,520 \pm 0,010	-0,049 \pm 0,019	0,024 \pm 0,001	-0,013 \pm 0,001
L6	0,624 \pm 0,011	-0,143 \pm 0,020	0,052 \pm 0,003	-0,008 \pm 0,003
L7	1,035 \pm 0,007	-0,290 \pm 0,011	0,033 \pm 0,001	-0,005 \pm 0,002
Mittel ^a	0,653 (0,182)	-0,113 (0,088)	0,040 (0,014)	-0,014 (0,008)

Tabelle 5.3: **Druckabhängige Relaxationszeiten der Lipidgruppen in Oozyten von *X. laevis* bei 293 K.** T_1 aus Gleichung 2.26, T_2 aus Gleichung 2.27. T_1° und T_2° beziehen sich auf Atmosphärendruck von 0,1 MPa; δT_x ist die Steigung des linearen Fits der Druckabhängigkeit. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %.
^aBerechnete Mittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern.

$0,049 \pm 0,001$ s. Die kleinsten Zeiten offenbarten sich bei L_4 und L_5 mit jeweils $0,024 \pm 0,001$ s. Der Mittelwert der Spin-Spin-Relaxationszeiten aller Lipidsignale war $0,040$ s und somit eine Größenordnung kleiner als derjenige der T_1 -Zeit (Tabelle 5.3).

Die größten Druckabhängigkeiten der T_2 -Zeit zeigten L_1 und L_2 mit jeweils $-0,025$ s 100MPa^{-1} . Diese waren nahezu doppelt so groß wie die durchschnittliche Abnahme von $-0,014$ s 100MPa^{-1} . L_3 und L_5 wiesen eine mittlere Reduktion der T_2 -Zeit auf, wohingegen die geringsten druckinduzierten Änderungen der transversalen Relaxation bei L_4 ($-0,007 \pm 0,001$ s 100MPa^{-1}), L_6 ($-0,008 \pm 0,003$ s 100MPa^{-1}) und L_7 ($-0,005 \pm 0,002$ s 100MPa^{-1}) messbar waren (Tabelle 5.3).

5.2.2.5 Berechnete Rotatorische Korrelationszeit τ_{rot}

Sind die beiden NMR-relevanten Relaxationszeiten T_1 und T_2 bekannt, so lässt sich mittels Gleichung 2.34 die rotatorische Korrelationszeit τ_{rot} bestimmen. In Tabelle 5.4 sind die berechneten Ergebnisse aus den T_1 - T_2 -Paaren aus Tabelle 5.3 des jeweiligen Druckes zu sehen.

	τ_{rot}^0 [10^{-9} s]	$\delta\tau_{\text{rot}}$ [10^{-9} s 100MPa^{-1}]
L1	$4,1 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,4$
L2	$3,7 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3$
L3	$4,7 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,6$
L4	$6,2 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,5$
L5	$5,8 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,9$
L6	$4,1 \pm 0,3$	$-0,4 \pm 0,4$
L7	$7,5 \pm 0,4$	$-0,8 \pm 0,6$
Mittel ^a	$5,1 (1,3)$	$1,1 (1,3)$

Tabelle 5.4: Rotatorische Korrelationszeit τ_{rot} der Lipidsignale in Oozyten von *X. laevis*. Werte berechnet mit Gleichung 2.34 aus den Ergebnissen von Tabelle 5.3; τ_{rot}^0 stellt den Wert bei $0,1$ MPa dar, $\delta\tau_{\text{rot}}$ die Steigung aus dem linearen Fit. Temperatur 293 K, Druck von $0,1$ MPa bis 100 MPa. Fehlerangaben aus linearem Fit nach Gewichtung auf Fortpflanzungsfehler beziehen sich auf ein Konfidenzniveau von 95 %. ^aBerechnete Mittelwerte mit Standardabweichung σ in Klammern.

Die rotatorische Korrelationszeit τ_{rot} der Lipidsignale in Oozyten von *X. laevis* wies einen Mittelwert von $5,1 \cdot 10^{-9}$ s auf. Die Streuung um diesen Mittelwert war mit $1,3 \cdot 10^{-9}$ s relativ gering. Der größte Wert konnte bei L_7 mit $(7,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$ s berechnet werden, der kleinste bei L_2 mit $(3,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-9}$ s. Die druckinduzierte Änderung führte mit einem Mittelwert von $1,1 \cdot 10^{-9}$ s 100MPa^{-1} zumeist zu längeren Korrelationszeiten. Eine Ausnahme hiervon stellten L_6 ($(-0,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-9}$ s 100MPa^{-1}) und L_7 ($(-0,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-9}$ s 100MPa^{-1}) dar (Abbildung 5.11). Der stärkste Anstieg war bei L_5 mit $((3,0 \pm 0,9) \cdot 10^{-9}$ s $100\text{MPa}^{-1})$ zu verzeichnen.

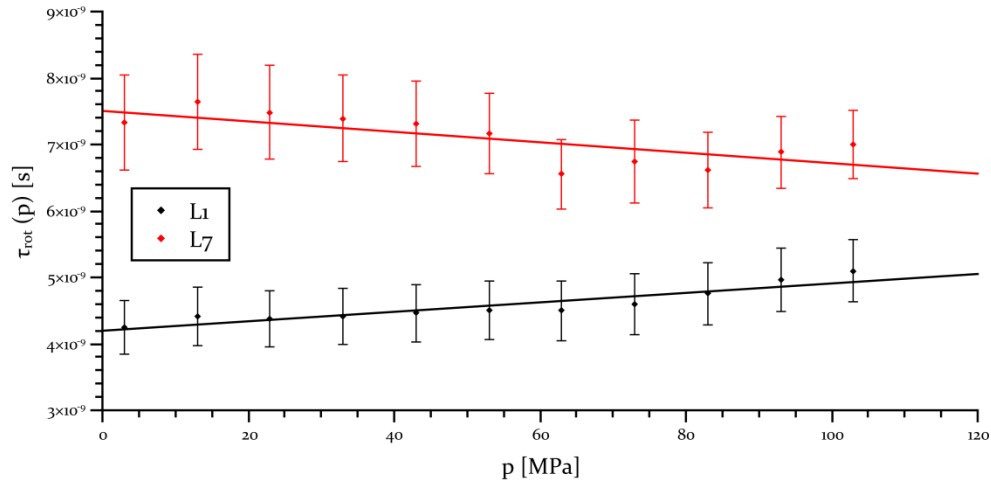


Abbildung 5.11: **Druckabhängige Rotatorische Korrelationszeiten.** Die Lipidsignale L_1 (schwarz) und L_7 (rot) in Oozyten von *X. laevis* berechnet mit Gleichung 2.34 aus den Werten der Tabelle 5.3. Fehler ergeben sich aus der Fortpflanzung der Fehler in Tabelle 5.3. Durchgezogene Linien: linearer Fit mit einem Determinationskoeffizienten R^2 von 0,86 (schwarz) und 0,52 (rot).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Druckabhängigkeit des Signalvolumens

Bereits bei der Betrachtung der gruppenspezifischen Intensitätsabnahme der Signalvolumina zeigt sich der Zusammenhang zwischen der Position innerhalb einer Fettsäurekette und der damit verbundenen druckinduzierten Reduktion. So behalten die Methingruppen der Doppelbindung bei einer Drucksteigerung die größte relative Intensität. Sie besitzen somit unter hohem Druck die größte Mobilität, gefolgt von der Methylengruppe in der Nähe einer Doppelbindung (L_6) und der Methylgruppe (L_1) am Schwanz der Kette. Daraus folgend ist der Anteil von Signalen der relativ starren CH_3 -Gruppen von Cholesterin hier als gering einzuschätzen. Der starke Einbruch der Intensität, speziell hin zur Kopfgruppe, lässt eine immobilisierende Wechselwirkung zwischen benachbarten Fettsäureketten innerhalb von Triacylglycerolen vermuten. Ein kontinuierliches Verbreitern der Signale konnte hierbei nicht beobachtet werden.

Bei der Analyse der thermodynamischen Parameter zeichnen sich die Methingruppen der Doppelbindung mit einer überdurchschnittlichen Änderung der freien Energie aus. Wohingegen bei der Änderung des molaren Volumens die sich häufig wiederholende Methylengruppe (L_2) hervorsticht. Eine erhöhte Änderung des Kompressibilitätsfaktors zeichnet die mobilen Bereiche L_1 , L_6 und L_7 aus. Eben diese Signale weisen zudem einen großen Anteil druckunabhängiger Beiträge auf. Speziell die Methingruppen besitzen in den beiden sichtbaren Kompartimenten mit $0,11 \pm 0,01$ den geringsten Anteil druckabhängiger Signale,

welcher obendrein die geringste relative Druckabhängigkeit von nur $6 \pm 2 \%$ aufweisen. Die Mobilität der Doppelbindung ist somit in nur sehr geringem Maße von Druck beeinflussbar. Diese Eigenschaften lassen sich ebenso noch in der Umgebung der Doppelbindung nachweisen.

5.3.2 Druckabhängigkeit der Relaxationszeiten

Noch direkter zeigt sich der Effekt der Mobilitätsvariation, vermittelt durch den Druckeinfluss, bei der Analyse der Relaxationszeiten. Speziell bei der longitudinalen Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 offenbart sich das Mobilitätsverhalten der einzelnen Lipidsignale in Bezug auf ihren Ursprung von gesättigten oder ungesättigten Bereichen der Fettsäurekette. Bereits bei atmosphärischem Druck weisen wieder die Methingruppen der Doppelbindung sowie die Methylgruppen am Ende der Kette die längsten Relaxationszeiten auf. Sie sind dadurch wiederum als am mobilsten zu bezeichnen. Unter den Methylengruppen zeichnet sich diejenige deutlich durch eine vergrößerte Zeit aus, welche zwischen zwei Doppelbindungen zu lokalisieren ist. Selbst bei L_4 lässt sich noch leicht diese Nähe der Doppelbindung erkennen. Die beiden kürzesten Relaxationszeiten dagegen besitzen L_3 und L_5 an der Kopfgruppe der Fettsäurekette.

Ist die longitudinale Relaxationszeit T_1 mehr abhängig von der Viskosität der Umgebung der Spins, so zeigt die transversale Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 eine stärkere Abhängigkeit von mikroskopischen Anisotropien des magnetischen Feldes [Levo8]. Somit ist die Zeitkonstante der transversalen Relaxationsrate eine feine Sonde für kleine Fluktuationen in der Umgebung des Signalursprungs. Folgerichtig zeigt somit, aufgrund ihrer hohen Symmetrie, die Methylgruppe die längste T_2 -Zeit. Die Methingruppe dagegen zeichnet sich durch eine unterdurchschnittlich kurze Relaxationszeit aus, was auf die geknickte Geometrie der Doppelbindung zurückzuführen ist, welche zu größeren Störungen des lokalen magnetischen Feldes führt. Die geringste lokale Symmetrie weisen die sich nahe an einer einzelnen Doppelbindung befindenden beziehungsweise unmittelbar auf das Glycerol-Rückgrat folgenden Methylengruppen auf. Dies führt zu den hier kürzesten T_2 -Zeiten bei atmosphärischem Druck.

Die Druckabhängigkeiten der transversalen Relaxationszeiten wiederum offenbaren ein sehr gruppenspezifisches Bild. So nehmen die T_2 -Zeiten von gesättigten Regionen der Fettsäurekette (L_2 , L_3 und L_5) innerhalb von 100 MPa um ungefähr die Hälfte ab, wohingegen die T_2 -Zeiten der ungesättigten Regionen (L_4 , L_6 und L_7) nahezu unberührt von der Druckänderung bleiben (Tabelle 5.3). Aus dem Kehrwert der transversalen Relaxationszeit lässt sich die Linienbreite der Resonanz berechnen. Mit den abnehmenden T_2 -Zeiten aus Tabelle 5.3 ist somit auch eine kontinuierliche Verbreiterung der jeweiligen Resonanzlinie verbunden, welche proportional zum Betrag der Druckänderung der T_2 -Zeit ist. Daraus wird ersichtlich, dass die Doppelbindung den absolut geringsten Einfluss des steigenden Druckes aller sichtbaren Fraktionen wahrnimmt. Diese geringe Verbreiterung der Linien ist im Spektrum nicht ersichtlich, was an der starken inhomogenen Linienverbreiterung (Tabelle 5.1) begründet liegt. Sie zeigt aber eine leichte, druckinduzierte Mobilitätsabnahme innerhalb aller sichtbaren Fraktionen an.

5.3.3 Interpretation der rotatorischen Korrelationszeit

Die rotatorische Korrelationszeit ist ein direktes Maß sowohl der Mobilität von Moleküle als auch ganzer Komplexe, wenn man vom Fall der isotropen Relaxation ausgeht. Mit ihrer Hilfe lassen sich folglich Aussagen über die Viskosität der Umgebung machen und damit auch über deren Abhängigkeit von Parametern wie Druck oder Temperatur.

Allerdings zeigte sie hinsichtlich der spezifischen Eigenschaften der Lipidsignale keine signifikante Variation. Erstaunlicher Weise besitzt sogar die hochmobile Methingruppe der Doppelbindung (*L7*) die größte Korrelationszeit. Die druckabhängige Änderung von τ_{rot} birgt hier sogar noch größere Besonderheiten, beschreibt sie doch für *L6* und *L7* eine zunehmende Beweglichkeit.

Die Arbeit von Lipari et al. [Lip82], auf der die Herleitung von τ_{rot} gründet, bezieht sich indes mehr auf Rotationen ganzer Komplexe. Dieser Betrachtungsweise folgend lassen sich aus den Daten ebenfalls Rückschlüsse auf die rotatorische Bewegung ganzer Lipidkörper innerhalb des Zytoplasmas und damit auf die druckabhängige Viskosität dessen ziehen. Bei einem durchschnittlichen Radius der Lipidtröpfchen von $1,25 \mu\text{m}$ [Spo71] und einer mittleren Korrelationszeit τ_{rot} von $5,1 \cdot 10^{-9} \text{ s}$ (Tabelle 5.4) ergibt sich aus Gleichung 2.28 eine Viskosität des Zytoplasmas von 1,5 cP (cP: Centipoise, 1P = $0,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$). Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem Review von Luby-Phelps [Lub00], welches Viskositäten des Zytoplasmas in lebenden Zellen von 1 cP bis 11 cP angibt. Hierbei sind sehr große Zellen, wie im vorliegenden Fall die Oozyten, am unteren Ende dieser Skala anzutreffen. Bei einer durchschnittlichen Zunahme von $1,1 \cdot 10^{-9} \text{ s } 100 \text{ MPa}^{-1}$ (Tabelle 5.4) von τ_{rot} ergibt sich aus Gleichung 2.28 eine zytoplasmatische Viskosität von 1,9 cP bei 100 MPa. Dies entspricht einer Zunahme der Zähflüssigkeit des Zellinneren von 21 % innerhalb des untersuchten Druckbereiches.

5.3.4 Druckabhängige Vitalitätsmessungen der Oozyten

Die Voltage Clamp Messungen der Membranspannung belegen die Vitalität der Oozyten im untersuchten Druckbereich bis 120 MPa. Aus Sicht der Lipide, welche sich in ihrer nativen Umgebung innerhalb des Zytoplasmas der Zellen befinden, ist diese Studie somit als *in-vivo* zu bezeichnen. Die vermuteten, druckinduzierten Änderungen der Zellmembran konnten in den NMR-spektroskopischen Experimenten nicht überprüft werden. Dies stellt einen interessanten Ansatzpunkt zukünftiger Projekte dar. Es gilt die Voltage Clamp Ergebnisse von Wilhelm [Wil12] zu präzisieren und ihre Auswirkungen auf das NMR-Spektrum zu analysieren.

5.3.5 Resümee der In-Vivo-Lipid-HP-NMR-Spektroskopie

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse dahingehend deuten, dass alle sichtbaren Lipide ein druckabhängiges Signolvolumen aufweisen (T_2 -Verbreiterung). Der Grad dieser

allgemeinen Druckabhängigkeit ist insgesamt recht gering und variiert von Signal zu Signal. Ein ebenfalls von Signal zu Signal unterschiedlicher Teil der sichtbaren Lipide durchläuft zusätzlich einen Phasenübergang von einer sichtbaren, flüssigkristallinen Fraktion hin zu einer kolloidalen, gelartigen Fraktion geringster Mobilität. Der sprunghafte Charakter eines solchen Phasenüberganges zeigt sich im kompletten Fehlen eines kontinuierlichen Verbreiterns der Resonanzlinien im Spektrum auf großer Skala. Würden die Lipide einen fließenden Übergang hin zur dieser vollständigen Unsichtbarkeit vollziehen, so müssten die Linienbreiten die Werte aus Tabelle 5.1 übersteigen. Diese Zwischenstufen der Mobilität, welche noch NMR-sichtbar wären, sich aber durch extrem breite Linien von der anfänglichen Fraktion abgrenzen würden, konnten nicht gefunden werden. Die kleinen Verbreiterungen, welche sich aus der Abnahme der T_2 -Zeit ergeben, beschreiben hierbei einen nur leicht immobilisierenden Effekt innerhalb der noch sichtbaren Fraktion. Eine merkliche Reduktion der Signalvolumina ist dadurch nicht beschrieben.

Der beschriebene Phasenübergang wird nun nicht von allen Regionen der Fettsäureketten gleichmäßig durchlaufen, sondern gewichtet nach ihren strukturellen Unterschieden. Die langgestreckten, gesättigten Bereiche und die Regionen nahe am rigiden Glycerol-Rückgrat von Triacylglycerolen vollziehen ihn früher. Die mobile Methylgruppe am Schwanz der Kette und ganz besonders die ungesättigten Bereiche der Doppelbindungen tun dies erst bei höheren Drücken.

Dieser Zusammenhang spricht für die vermutete Ausbildung von Van-der-Waals Kräften als Ursachen der Immobilisierung.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Grundvoraussetzungen für die Messung druckinduzierter Änderungen thermodynamischer Parameter mittels Kernspinresonanzspektroskopie sind die Verlässlichkeit sowie die Präzision der verwendeten Hochdruckapparaturen. Die Neukonstruktion des Autoklaven, welcher den druckdichten Zusammenschluss des Probenröhrchens mit der Hochdruckleitung der Druckerzeugungseinheit darstellt, gewährleistet die kontaminationslose Applikation hoher hydrostatischer Drücke auf die Probe. Das kommerziell nicht verfügbare, automatisierte sowie in die Steuerung des NMR-Spektrometers integrierte Druckregelsystem ermöglicht das völlig autonome Erheben hochaufgelöster Datensätze druckabhängiger Observablen in Kernspinresonanzexperimenten mit größtmöglicher Zeiteffizienz. Durch die eigens entwickelte Kommunikation zwischen der Spektrometerkonsole und der Druckerzeugungseinheit, konnte die Steuerung des Druckverlaufs auf den Spektrometerrechner übertragen werden.

Mit der neu konzipierten sowie realisierten Drucksprungeinrichtung lassen sich schnelle Druckänderungen bis 200 MPa innerhalb von 12 ms erzeugen. Dies stellt eine beachtliche Beschleunigung der Druckänderung um bis zu einen Faktor 4 gegenüber der Anlage aus dem Jahre 2002 dar. Folglich wird die Zeitskala der möglichen Aufklärung dynamischer Prozesse biochemisch aktiver Makromoleküle signifikant erweitert. Das dabei erarbeitete Grundlagenwissen über die Druckausbreitung innerhalb der Anlage half ganz entscheidend, die gesetzten Ziele zu erreichen. Neben der neu geschaffenen Fähigkeit eines Sprunges zwi-

schen zwei beliebigen Druckniveaus, mittels vorab mit Druck beaufschlagter Reservoirs, konnte zudem die Bedienbarkeit des Gesamtsystems enorm erhöht werden. Dieses, ebenfalls vom NMR-Spektrometer gesteuerte System, garantiert die exakte Wiederholung definierter Druckänderungen über die Dauer der großen Wiederholraten der Experimente.

Durch die Verwendung terminal geschützter Random-Coil-Peptide konnte der druckabhängige Einfluss geladener Gruppen auf die Druckantworten gemindert werden. Die größten Druckabhängigkeiten sowohl erster als auch zweiter Ordnung der ^1H chemischen Verschiebung werden bei den Amidprotonen des Rückgrates entdeckt. Ihre Mittelwerte betragen $0,523 \text{ ppm GPa}^{-1}$ sowie $-0,41 \text{ ppm GPa}^{-2}$. Die stärkste Druckantwort erster Ordnung besitzt Threonin mit $0,755 \pm 0,024 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Den am meisten gekrümmten Verlauf der Druckabhängigkeit zeigt Tyrosin mit $-0,82 \pm 0,25 \text{ ppm GPa}^{-2}$. Die geringste druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung von Amidprotonen weist Glycin mit $0,239 \pm 0,012 \text{ ppm GPa}^{-1}$ auf.

Bei den H^α -Protonen sind Mittelwerte der beiden Druckkoeffizienten B_1 und B_2 von $-0,034 \text{ ppm GPa}^{-1}$ beziehungsweise $0,029 \text{ ppm GPa}^{-2}$ messbar. Im Gegensatz zu den Amidprotonen ist hier eine druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung sowohl in Richtung Tief- als auch in Richtung Hochfeld zu verzeichnen. Die stärksten Effekte erster Ordnung sind demnach in Glycin mit $0,077 \pm 0,003 \text{ ppm GPa}^{-1}$ und in Leucin mit $-0,132 \pm 0,016 \text{ ppm GPa}^{-1}$ zu finden. Den geringsten Absolutwert der linearen Druckabhängigkeit weist Prolin in trans-Konformation auf ($-0,0061 \pm 0,0004 \text{ ppm GPa}^{-1}$). Die stärkste Rechtskrümmung des Druckverlaufes der Resonanzfrequenz der H^α -Protonen zeichnet Glutamat ($-0,198 \pm 0,030 \text{ ppm GPa}^{-2}$) aus, die stärkste Linkskrümmung Tyrosin ($0,221 \pm 0,048 \text{ ppm GPa}^{-2}$).

Am insgesamt stabilsten gegenüber Druckvariation erweisen sich die Resonanzfrequenzen von Cystein $\text{H}^{\beta_2/\beta_3}$ und Threonin H^β mit $-0,001 \pm 0,001 \text{ ppm GPa}^{-1}$ beziehungsweise $-0,001 \pm 0,003 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Die beiden H^β -Resonanzfrequenzen von fünf Aminosäuren zeigen jeweils einen gegenläufigen Druckverlauf. Es sind dies Glutamat, Histidin, Leucin, Phenylalanin und Tyrosin. Die Extrema der linearen Druckabhängigkeit stellen Aspartat ($0,083 \pm 0,008 / 0,073 \pm 0,007 \text{ ppm GPa}^{-1}$) und eine der beiden stereospezifisch nicht zugeordneten Resonanzen von Glutamat ($-0,190 \pm 0,035 \text{ ppm GPa}^{-1}$) dar. Die stärkste Nichtlinearität der H^β -Druckantwort besitzt Leucin mit $0,57 \pm 0,12 \text{ ppm GPa}^{-2}$.

Bei den weiteren Protonen der Seitenketten zeichnet sich Lysin (H^γ) $_3^+$ durch den betragsmäßig größten Druckkoeffizienten erster Ordnung aus ($-0,438 \pm 0,034 \text{ ppm GPa}^{-1}$), gefolgt von Glutamin $\text{H}^{\epsilon_{22}}$ mit $0,410 \pm 0,011 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Die größten Druckkoeffizienten zweiter Ordnung sind bei Tryptophan H^{ϵ_1} mit $0,63 \pm 0,05 \text{ ppm GPa}^{-2}$ und Glutamin $\text{H}^{\epsilon_{22}}$ mit $-0,28 \pm 0,05 \text{ ppm GPa}^{-2}$ zu finden.

Die Resonanzfrequenzen von ^{15}N verschieben sich mit steigendem Druck ausnahmslos in Richtung Tieffeld. Das cis-Isomer von Prolin weist mit $1,36 \pm 0,02 \text{ ppm GPa}^{-1}$ den kleinsten Druckkoeffizienten erster Ordnung der Rückgrat ^{15}N chemischen Verschiebung auf, in trans-Konfiguration aber einen durchschnittlichen ($2,45 \pm 0,02 \text{ ppm GPa}^{-1}$). Den größten Wert im Rückgrat besitzt Glycin mit $3,79 \pm 0,08 \text{ ppm GPa}^{-1}$, bei einem Mittelwert der druckinduzierten Änderung der chemischen Verschiebung in erster Näherung von $2,91 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Die stärkste Krümmung zeigt Tyrosin mit $-4,52 \pm 0,32 \text{ ppm GPa}^{-2}$, die geringste wiederum das cis-Isomer von Prolin ($-0,38 \pm 0,10 \text{ ppm GPa}^{-2}$).

Die insgesamt größte druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung aller ^{15}N findet sich bei N^δ in Asparagin mit $7,65 \pm 0,20 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Das generell am meisten nichtlineare Druckverhalten besitzen die Resonanzen der Guanidinogruppe von Arginin mit $-8,83 \pm 0,91 \text{ ppm GPa}^{-2}$ beziehungsweise $-6,03 \pm 0,88 \text{ ppm GPa}^{-2}$.

Sequenzabhängige Korrekturfaktoren veranschaulichen zudem druckinduzierte Einflüsse verschiedener Aminosäurereste auf ihre nähere Umgebung. Die Druckkoeffizienten erster Ordnung werden lediglich in ihrer Stärke, nicht in ihrem Vorzeichen beeinflusst. So erhöht Prolin die lineare Druckabhängigkeit des Amidprotons von Gly1 um $0,25 \text{ ppm GPa}^{-1}$, Tyrosin und Valin dagegen reduzieren diese bei Gly2 um $0,13 \text{ ppm GPa}^{-1}$. Der Druckkoeffizient zweiter Ordnung, ergo das Krümmungsverhalten, unterliegt durchaus einem sequenzabhängigen Vorzeichenwechsel, wie gezeigt werden konnte.

Der starke Einfluss des Lösungsmittels auf die Rückgrat Amidgruppen verdeutlicht sich in der druckabhängigen $^1J_{N-H}$ -Kopplungskonstanten der indirekten Spin-Spin-Wechselwirkung. Dieser Zusammenhang konnte exemplarisch mittels MD-Simulation am Beispiel von Isoleucin verifiziert werden. Die Varianz der aminosäurespezifischen Kopplung von $3,4 \text{ Hz}$ bei einem atmosphärischen Mittelwert von $-94,5 \text{ Hz}$ vergrößert sich auf $6,2 \text{ Hz}$ bei 200 MPa mit einem nur leicht veränderten Mittelwert von $-95,4 \text{ Hz}$. Somit hängt die Richtung der druckabhängigen Änderung der Kopplungskonstanten der Amidgruppen vom jeweiligen Aminosäurerest ab.

Eine starke lineare Korrelation ($0,61$) der Größe der indirekten Spin-Spin-Wechselwirkung mit der Neigung einer Aminosäure, β -Stränge zu bilden, offenbart einen spezifischen Zusammenhang der Kopplungskonstanten mit Motiven der Sekundärstruktur.

Die In-vivo-HP-NMR-Spektroskopie an Oozyten von *X. laevis* eröffnet einen nichtinvasiven Zugang zur Aufklärung der biochemischen Druckmodifikation der Zellmembran sowie des Zusammenhanges zwischen Mobilität und Signalvolumen bei Lipiden. Der strukturelle, lokale Charakter von Fettsäureketten bestimmt ganz wesentlich den Druckeinfluss auf die Mobilität. Der Anteil der Lipide, welche einen Phasenübergang hin zur gelartigen Immobilisierung durchlaufen, ist am geringsten für die Methingruppen der Doppelbindungen. Das Verhältnis des Kompartiments des Phasenübergangs zum druckunabhängigen Kompartiment beträgt hier lediglich $0,11 \pm 0,01$. Bei den Methylengruppen nahe am Glycerol-Rückgrat von Triacylglycerolen ist das Verhältnis beider Spezies mit $0,99 \pm 0,04$ ausbalanciert. Hier vollzieht die Hälfte der sichtbaren Signale einen Phasenübergang. Diesem Verhalten überlagert existiert eine kontinuierliche, geringe T_2 -Verbreiterung der Lipidsignale. Die strukturellen Unterschiede der Signalursprünge manifestieren sich darin ebenso. Mit $5 \pm 2 \text{ ms}$ pro 100 MPa verringert sich die transversale Relaxationszeit der Methingruppen am wenigsten. Dem gegenüber liegen die Methyl- sowie die sich häufig wiederholenden Methylengruppen gesättigter Bereiche mit je 25 ms pro 100 MPa . Durch die Analyse der rotatorischen Korrelationszeit konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Steigerung der zytoplasmatischen Viskosität in Oozyten von *X. laevis* um 21% zwischen $0,1 \text{ MPa}$ und 200 MPa nachgewiesen werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

[Akao6] Akasaka, K. 2006. Probing conformational fluctuations by pressure perturbations. *Chem. Rev.*, Vol. 106, pp. 1814-1835.

[Ala94] Ala-Korpela, M., et al. 1994. ¹H NMR-based absolute quantification of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma. *J. Lipid Res.*, Vol. 35, pp. 2292-2304.

[Arno2a] Arnold, M. 2002. Hochdruck NMR. Dissertation Universität Regensburg.

[Arno2b] Arnold, M. R., et al. 2002. ¹H-NMR parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides Gly-Gly-X-Ala at pressures between 0.1 and 200 MPa. *Biophys. Chem.*, Vol. 96, pp. 129-140.

[Asa98] Asakawa, N., et al. 1998. Structural studies of hydrogen-bonded peptides and polypeptides by solid state NMR. *Ann. Reports NMR Spectr.*, Vol. 35, pp. 56-137.

[Aza13] Azarkh, M., et al. 2013. Site-directed spin-labeling of nucleotides and the use of in-cell EPR to determine long-range distances in a biologically relevant environment. *Nature Protocols*, Vol. 8, pp. 131-147.

- [Bal91] **Baldwin, A. J. and Kay, L. E. 2009.** NMR spectroscopy brings invisible protein states into focus. *Nat. Chem. Biol.*, Vol. 11, pp. 808-814.
- [Bal98] **Ballard, L., et al. 1998.** A High-Pressure, High-Resolution NMR Probe for Experiments at 500 MHz. *J. Mag. Res.*, Vol. 133, pp. 190-193.
- [Bau11] **Baumstark, D. 2011.** NMR-Spektroskopie an Lipoproteinen und Lipoproteinsubklassen. Dissertation Universität Regensburg.
- [Bec10] **Beck Erlach, M., et al. 2010.** Ceramic cells for high pressure NMR spectroscopy of proteins. *J. Mag. Res.*, Vol. 204, pp. 196-199.
- [Bel99] **Belogol'skii, V.A., et al. 1999.** Pressure dependence of the sound velocity in distilled water. *Meas. Tech.*, Vol. 42, pp. 406-413.
- [Buc60] **Buckingham, A. D. 1960.** Chemical shifts in the nuclear magnetic resonance spectra of molecules containing polar groups. *Can. J. Chem.*, Vol. 38, pp. 300-307.
- [Bun79a] **Bundi, A. and Wuethrich, K. 1979.** ¹H-NMR Parameters of the Common Amino Acid Residues Measured in Aqueous Solutions of the Linear Tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers*, Vol. 18, pp. 285-297.
- [Bun79b] **Bundi, A. and Wuethrich, K. 1979.** Use of Amide ¹H-NMR Titration Shifts for Studies of Polypeptide Conformation. *Biopolymers*, Vol. 18, pp. 299-311.
- [Cav07] **Cavanagh, J., et al. 2007.** *Protein NMR Spectroscopy*. Elsevier Academic Press, San Diego, ISBN: 012164491X.
- [Col68] **Cole, K. S. 1968.** *Membranes, Ions and Impulses*. University of California Press, Los Angeles, ISBN: 0520002512.
- [Das87] **Dascal, N. 1987.** The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *Rev. Biochem.*, Vol. 22, pp. 317-387.
- [Dav92] **Davis, A. L., et al. 1992.** Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.*, Vol. 98, pp. 207-216.
- [Fas89] **Fasman, G. D. 1989.** *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. Plenum Press, New York, ISBN: 030643139.
- [Gra12] **Gratwicke, B. 2012.** [Online seit] 30. Dez. 2012. [Online gesehen] 06. Feb. 2014. <http://www.flickr.com/photos/19731486@No7/8325732255>.
- [Gur62] **Gurdon. 1962.** The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, Vol. 34, pp. 93-112.

[Gur96] **Gurdon, J. B. 1996.** Introductory comments: *Xenopus* as a laboratory animal. pp. 3-6, [Buchautor] Tinsley, R. C.; Koble, H. C. *The biology of Xenopus*. Clarendon Press, Oxford, ISBN 0198549741.

[Hak00] **Hakumäki, J. M. and Kauppinen, R. A. 2000.** ¹H NMR visible lipids in the life and death of cells. *TIBS.*, Vol. 25, pp. 357-362.

[Har13] **Harsch, T., et al. 2013.** Stereospecific Assignment of the Asparagine and Glutamine Side Chain Amide Protons in Random-Coil Peptides by Combination of Molecular Dynamic Simulations with Relaxation Matrix Calculations. *Appl. Magn. Reson.*, Vol. 44, pp. 319-331.

[Hau89] **Hauser, K. H. and Kalbitzer, H. R. 1989.** *NMR für Mediziner und Biologen*. Springer Verlag, Berlin, ISBN 3540502815.

[Her98] **Heremans, K. and Smeller, L. 1998.** Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1386, pp. 353-370.

[Heu10] **Heuert, U., et al. 2010.** NMR probe for pressure-jump experiments up to 250 bars and 3 ms jump time. *Rev. Sci. Instrum.*, Vol. 81, pp. 105102-1-105102-8.

[Hub11] **Hubert, A. 2011.** Hochdruck-NMR am Ras-Protein. Diplomarbeit Universität Regensburg.

[Ino00] **Inoue, K., Yamada, H. and Akasaka, K. 2000.** Pressure-induced local unfolding of the Ras binding domain of RalGDS. *Nature Struct. Biol.* 2000, Vol. 7, pp. 547-550.

[Jon71] **Jonas, J. 1971.** Nuclear Magnetic Resonance Measurements at High Pressure. *Rev. Sci. Instrum.*, Vol. 43, p. 643.

[Kac06] **Kachel, N., et al. 2006.** Observation of intermediate states of the human prion protein by high pressure NMR spectroscopy. *BMC Structural Biology*, Vol. 6, p16.

[Kal00] **Kalbitzer, H. R., Görler, A. and Li, H. 2000.** ¹⁵N and ¹H NMR study of Histidine containing protein (HPr) from *Staphylococcus carnosus* at high-pressure. *Protein Sci.*, Vol. 9, pp. 693-703.

[Kalo6] **Kalbitzer, H. R., et al. 2006.** Proceedings of 47th ENC, Asilomar, p. 17.

[Kal13] **Kalbitzer, H. R., et al. 2013.** Intrinsic Allosteric Inhibition of Signaling Proteins by Targeting Rare Interaction States Detected by High-Pressure NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Edit.*, Vol. 52, pp. 14242-14246.

[Kano0] **Kanelisa, V., et al. 2000.** Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: Application to modular binding domain complexes. *J. Biomol. NMR*, Vol. 16, pp. 253-259.

[Kim93] **Kim, C. and Berg, J. M. 1993.** Thermodynamic β -sheet propensities measured using a zinc-finger host peptide. *Nature*, Vol. 362, pp. 267-270.

- [Kit02] Kitahara, R., et al. 2002. Equilibrium and Pressure-jump Relaxation Studies of the Conformational Transitions of P13. *J. Mol. Biol.*, Vol. 320, pp. 609-628.
- [Kit13] Kitahara, R., et al. 2013. Pressure-induced Chemical Shifts as Probes for Conformational Fluctuations in Proteins. *Progr. NMR Spec.*, Vol. 71, pp. 35-58.
- [Kja11] Kjaergaard, M., Brander, S. and Poulsen, F. M. 2011. Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: Effects of temperature and pH. *J. Biomol. NMR*, Vol. 49, pp. 139-149.
- [Koe12] Koehler, J., et al. 2012. Pressure Dependence of ^{15}N Chemical Shifts in Model Peptides Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH₂. *Materials*, Vol. 5, pp. 1774-1786.
- [Koe14] Koehler, J., et al. 2014. Non-linear pressure response of amide one-bond indirect spin-spin couplings in model peptides and proteins. [an J. Am. Soc. submitted].
- [Kre06] Kremer, W. 2006. High-pressure NMR studies in proteins. *Ann. Reports NMR Spectr.*, Vol. 57, pp. 177-203.
- [Kre07] Kremer, W., et al. 2007. Species specific differences in the intermediate states of human and Syrian hamster prion protein detected by high pressure NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, Vol. 282, pp. 22689-22698.
- [Kre11] Kremer, W., et al. 2011. Pulsed Pressure Perturbations, an Extra Dimension in NMR Spectroscopy of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 133, pp. 13646-13651.
- [Kue94] Kuesel, A. C., et al. 1994. ^1H MRS of High Grade Astrocytomas: Mobile Lipid Accumulation in Necrotic Tissue. *NMR in Biomedicine*, Vol. 7, pp. 149-155.
- [Lee06] Lee, S.-C., et al. 2006. Subcellular In Vivo ^1H MR Spectroscopy of *Xenopus laevis* Oocytes. *Biophys. J.*, Vol. 90, pp. 1797-1803.
- [Levo8] Levitt, M. H. 2008. *Spindynamics*. Wiley, Chichester, ISBN: 9780470511183.
- [LiH98] Li, H., Yamada, H. and Akasaka, K. 1998. Effect of pressure on individual hydrogen bonds in proteins. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, Vol. 37, pp. 1167-1173.
- [Lip82] Lipari, G. and Szabo, A. 1982. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. *J. Am. Soc.*, Vol. 104, pp. 4546-4559.
- [Lob14] Lobenhofer, K. 2014. NMR-basierte Metabolomik in der Diabetes-Früherkennung und Hochdruck-NMR-Spektroskopie an Lipoproteinen. *Dissertation Universität Regensburg*.
- [Lub00] Luby-Phelps, K. 2000. Cytoarchitecture and Physical Properties of Cytoplasm: Volume, Viscosity, Diffusion, Intracellular Surface Area. *Int. Rev. Cyto.*, Vol. 192, pp. 189-221.

- [Mar98] Markley, J. L., et al. 1998. Recommendations for the Presentation of NMR Structures of Proteins and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.*, Vol. 280, pp. 933-952.
- [Mun13] Munte, C. E., et al. 2013. Distinct Conformational States of the Alzheimer β -Amyloid Peptide Can Be Detected by High-Pressure NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Edit.*, Vol. 52, pp. 8943-8947.
- [Pol01] Polder H.-R., Swandulla D. 2001. The use of control theory for the design of voltage clamp systems: a simple and standardized procedure for evaluating system parameters. 2001, *J. Neurosci. Meth.*, Vol. 109, pp. 97-109.
- [Qui05] Quinlan R. J., Reinhart G. D. 2005. Baroresistant buffer mixtures for biochemical analyses. *Anal. Biochem.*, Vol. 341, pp. 69-76.
- [Rai79] Raiford D. S., Fisk C. L., Becker E. D. 1979. Calibration of methanol and ethylene glycol nuclear magnetic resonance thermometers. *Anal. Chem.*, Vol. 51, pp. 2050-2051.
- [Ram11] Ramm, P. 2011. High Field ^1H -NMR Spectroscopy on Cell Suspensions of Neural Progenitor Cells and Brain Tumor-Initiating Cells. Dissertation Universität Regensburg .
- [Sah08] Sahakyan, A. B., et al. 2008. Electric Field Effects on One-Bond Indirect Spin-Spin Coupling Constants and Possible. *J. Phys. Chem.*, Vol. 112, pp. 3576-3586.
- [Scho1] Schwarzsinger, S., et al. 2001. Shifts Sequence-Dependent Correction of Random Coil NMR Chemical. 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 123, pp. 2970-2978.
- [Seho1] Sehy, J. V., Ackerman, J. J. H. and Neil, J. J. 2001. Water and Lipid MRI of the *Xenopus* Oocyte. 2001, *Magnet. Reson. Med.*, Vol. 46, pp. 900-906.
- [Sim05] Simpson, A. J. and Brown, S. A. 2005. Purge NMR: Effective and easy solvent suppression. *J. Magn. Reson.*, Vol. 175, pp. 340-346.
- [Spo71] Spornitz, U. M. and Kress, A. 1971. Yolk-platelet Formation in Oocytes of *Xenopus laevis* (Daudin). *Z. Zellforsch.*, Vol. 117, pp. 235-251.
- [Sud96] Sudmeier, J. L., et al. 1996. HCN, A Triple-Resonance NMR Technique for Selective Observation of Histidine and Tryptophan Side Chains in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Labeled Proteins. *J. Magn. Reson.*, Vol. 113, pp. 236-247.
- [Tja96] Tjandra, N., Gresziek, S. and Bax, A. 1996. Magnetic Field Dependence of Nitrogen-Proton J Splittings in ^{15}N Enriched Human Ubiquitin Resulting from Relaxation Interference and residual Dipolar Coupling. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118, pp. 11329-11330.
- [Wag00] Wagner, C. A., et al. 2000. The Use of *Xenopus laevis* Oocytes for the Functional Characterization of Heterologously Expressed Membrane Proteins. *Cellular Physiol. Biochem.*, Vol. 10, pp. 1-12.

[Wil12] **Wilhelm, P. 2012.** Hochdruck NMR-Spektroskopie an Oozyten von *Xenopus laevis*. Bachelorarbeit Universität Regensburg.

[Wan95] **Wang, A. C., et al. 1995.** Sequential backbone assignment of isotopically enriched proteins in D₂O by deuterium-decoupled HA(CA)N and HA(CACO)N. *J. Biomol. NMR*, Vol. 5, pp. 376-382.

[Wis95] **Wishart, D. S., et al. 1995.** ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR*, Vol. 6, pp. 135-140.

[Xia13] **Xiang, S.-Q., et al. 2013.** N-H-Spinkopplungen: Einblicke in Proteinwasserstoffbruecken. *Angew. Chem.*, Vol. 125, pp. 3610-3613.

[Yam74] **Yamada, H. 1974.** Pressure-resisting glass cell for high pressure, high resolution NMR measurement. *Rev. Sci. Instrum.* Vol. 45, No.5. 1974.

8 DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei allen meinen Kollegen, Freunden und Unterstützern sehr herzlich bedanken, mir das Erstellen dieser Dissertation ermöglicht sowie erleichtert zu haben.

Im Besonderen bedanke ich mich bei

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer zu aller erst für das flexible Gestalten des Themas meiner Promotion. Desweiteren danke ich ihm für den großen Freiraum beim Planen und Aufbauen der Anlagen sowie für die allseits spannenden Diskussionen über Physik, Biologie und Biochemie, für die Unterstützung beim Anfertigen meiner Veröffentlichungen sowie dieser Dissertation, für die Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Konferenzen und für seine Art, mich stets zu motivieren und zu Neuem anzutreiben.

Prof. Dr. Werner Kremer für die Übernahme des Amtes des ersten Mentors der Graduiertenschule sowie für die vielen Hilfestellungen im Laufe meiner Promotion und ganz besonders für das Korrekturlesen dieser Dissertation

Prof. Dr. Hannelore Daniel für die Versorgung mit Oozyten

Dr. Ulrich Hammes für das Ermöglichen des Kontaktes mit dem Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie sowie die Einführung in die Technik der Voltage Clamp

Prof. Dr. Dominik Horinek für MD-Simulationen des Tetrapeptids

Dr. Alexander Lazarev von Pressure Biosciences Inc. für die exzellente Zusammenarbeit beim Entwickeln der automatischen Druckbank

Prof. Dr. Claudia E. Munte für die anfängliche Einführung in die Kernspinresonanzspektroskopie

Prof. Dr. Kazuyuki Akasaka für die Übernahme des Amtes des zweiten Mentors der Graduiertenschule sowie für die Benutzung seiner Labore und die interessanten Diskussionen während meines Aufenthaltes an seinem Institut in Japan

Markus Beck Erlach für seine enorme Kollegialität und Freundschaft, für seine Unterstützung während der ungezählten Stunden des Messens der Peptid-Daten und vor allem für seinen Rat in allen chemischen Fragen eines Physikers (air do sláinte!)

Dr. Edson Crusca Jr. für die Synthese der Peptide sowie für die Überprüfung ihrer Reinheit mittels Massenspektrometrie

Alexander Meier für die technische Unterstützung in Fragen der Elektronik beim Aufbau der automatischen Druckbank und der Drucksprungeinrichtung sowie für das Design der Platinen der beiden Mikroprozessoren

Dr. Michael Spörner und Dörte Repenning-Rochelt speziell für Rat und Tat in den Chemie-Laboren

und allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Biophysik für die freundliche und inspirierende Atmosphäre in unserem Team.

Ganz speziellen Dank möchte ich an dieser Stelle meiner Familie, meinen Eltern sowie Louis und Philippe und vor allem Tina aussprechen! Ohne deren Unterstützung, Nachsicht und Geduld, nicht nur in der Zeit des Verfassens dieser Dissertation, vieles so nicht möglich gewesen wäre.

9 ANHANG

9.1 Hochdruckanlagen

9.1.1 AU-Programm zur automatischen Drucksteuerung

```
1  AUERR = multizg_p(curdat);
2  QUITMSG("--- multizg_p finished ---")
3  #include <inc/exptUtil>
4  int multizg_p(const char* curdat){
5      int i1;           /* number of pressure steps */
6      int i2;           /* start pressure level */
7      int i3;           /* end pressure level */
8      int i4;           /* first experiment in each loop */
9      int i5;           /* number of experiments to loop */
10     int ex;           /* amount of max pressure exceeded */
11     int ct;           /* expno counter */
```

```

12 int pm;           /* maximum pressure available */
13 int ce;           /* current expno at beginning of AU */
14 int pe;           /* pressure setting experiment */
15 int wt;           /* waittime after pressure change */
16 int et;           /* experiment duration */
17 int rev;          /* marker for reversibility check */
18 float dp;         /* pressure steps */
19 float cv;         /* float for integer conversion */
20 char text[512];   /* messages */
21 et=0;
22 pm=200;           /*set max pressure*/
23 cv=1;            /* for conversion of integers */
24 ce = expno;       /* save current expno */
25 pe = 9999;        /* pressure setting expno */
26 GETINT("expno of pressure-setting pulse program:",pe);
27 i2=3;            /* get start-pressure */
28 (void) sprintf(text,"start-pressure (MPa) \n (%i MPa maximum)", pm);
29 GETINT(text, i2);
30 if(i2 > pm) {
31   ex=i2-pm;
32   (void) sprintf(text,"maximum pressure exceeded by %i MPa \n close to abort"
,ex);
33   Proc_err(1, text); /* 1 == DEF_ERR_OPT */
34   ABORT}
35 i3=3; /* get end-pressure */
36 (void) sprintf(text,"end-pressure (MPa) \n (%i MPa minimum & %i MPa maxi-
mum)", i2, pm);
37 GETINT(text, i3);
38 if(i3 > pm) {
39   ex=i3-pm;
40   (void) sprintf(text,"maximum pressure exceeded by %i MPa \n close to abort"
,ex);
41   Proc_err(1, text); /* 1 == DEF_ERR_OPT */
42   ABORT}
43 if(i2 > i3){ /* check dp bigger o */
44   (void) sprintf(text,"end-pressure smaller than start-pressure \n close to abort");
45   Proc_err(1, text); /* 1 == DEF_ERR_OPT */
46   ABORT}
47 GETINT("number of pressure steps :",i1); /* get number of steps */
48 dp=(i3-i2)/((i1-1)/cv); /* calculate pressure steps */
49 i4 = ce; /* get number of first experiment in each loop */
50 GETINT("number of first experiment:",i4);
51 i5 = 1; /* get number of experiments to loop */
52 (void) sprintf(text,"number of subsequent experiments to loop \n starting from
#%i \n (minimum 1 & maximum 10)", i4);
53 GETINT(text, i5);
54 if(i5 == 0){
55   (void) sprintf(text,"no experiment selected");
56   Proc_err(1, text); /* 1 == DEF_ERR_OPT */
57   ABORT}
58 if(i5 > 10){

```

```

59 (void) sprintf(text,"too many experiments selected");
60 Proc_err(1, text); /* 1 == DEF_ERR_OPT */
61 ABORT}
62 rev = 0; /* set reversibility check */
63 (void) sprintf(text,"reversibility check \n after pressure series back to %i MPa and
    1 more experiment loop \n o for NO \n or \n 1 for YES", i2);
64 GETINT(text, rev);
65 if(rev*rev > 1){
66 (void) sprintf(text,"reversibility check must be 1 or 0 for yes or no");
67 Proc_err(1, text); /* 1 == DEF_ERR_OPT */
68 ABORT}
69 wt = 10; /* pressure equilibration time for each experiment */
70 GETINT("pressure equilibration period (sec):",wt);
71 Proc_err(INFO_OPT,"generating experiments"); /* generate experiments */
72 TIMES(i5)
73 TIMES2(i1)
        REXPNO(i4+loopcount1+10*loopcount2);
        SETCURDATA
        et += CalcExpTime();
74 END
        if ( rev == 1){
        REXPNO(i4+loopcount1+10*loopcount2);
        SETCURDATA
        et += CalcExpTime();}
75 END
76 et += (i1+rev)*(60 + wt + 5);
77 if (rev == 1) { /* summary of setup -- last chance to abort */
78 (void) sprintf(text,"summary of your setup - last chance to abort \n\nstart-
    pressure: %i MPa \nend-pressure: %i MPa \ndP per step: %.2f MPa \npressure-
    setting expno: %i \nstart expno: %i \nend expno: %i \nwith reversibility check
    \ntotal duration: %i s", i2, i3, dp, pe, i4, (i4+i5)-1, et);}
79 if (rev == 0) {
        (void) sprintf(text,"summary of your setup - last chance to abort
        \n\nstart-pressure: %i MPa \nend-pressure: %i MPa \ndP per
        step: %.2f MPa \npressure-setting expno: %i \nstart expno: %i
        \nend expno: %i \nwithout reversibility check \ntotal duration: %i
        s", i2, i3, dp, pe, i4, (i4+i5)-1, et);}
80 if (Proc_err(QUESTION_OPT,text) != ERR_OK ){
        ABORT}
81 TIMES(i1) /* loop for all pressure steps */
82 (void) sprintf(text,"setting pressure to %.2f MPa", i2+loopcount1*dp);
        /*print what to do next*/
83 Proc_err(INFO_OPT,text);
84 REXPNO(pe); /* goto expno pressure change */
85 SETCURDATA
86 STOREPAR("D 10",(i2+loopcount1*dp)/1000); /* set pressure */
87 ZG
88 ssleep(wt); /* pressure equilibration */
89 (void) sprintf(text,"topshim running"); /* print what to do next */
90 Proc_err(INFO_OPT,text);
91 CPR_exec("topshim", WAIT_TERM); /* topshim */

```

```

92  ssleep(5);/* wait */
93  ct = (i4 + 10*loopcount1);    /* performing experiment loop */
94  TIMES2(i5)
      (void) sprintf(text,"experiment #%i @ p = %.2f MPa", loop-
      count2+1, i2+loopcount1*dp);    /* print what to do next */
      Proc_err(INFO_OPT,text);
      REXPNO( ct + loopcount2 );    /* acquisition */
      SETCURDATA
      ZG
      ssleep(2);
95  END /* end of experiment loop */
96  END /* end of pressure loop */
97  if (rev == 1) /* reversibility run */ {
98  (void) sprintf(text,"setting pressure to %.2f MPa \n for reversibility check", i2*cv);
99  Proc_err(INFO_OPT,text);
100 REXPNO(pe);    /* set pressure */
101 SETCURDATA
102 STOREPAR("D 10", i2/1000.0);
103 ZG
104 ssleep(wt); /* pressure equilibration */
105 (void) sprintf(text,"running topshim");    /* print what to do next */
106 Proc_err(INFO_OPT,text);
107 CPR_exec("topshim", WAIT_TERM);    /* topshim */
108 ssleep(5);    /* wait */
109 ct = (i4 + 10*loopcount1);    /* performing experiment loop for reversibility check

110 TIMES2(i5)
      (void) sprintf(text,"reversibility \n experiment #%i @ p = %.2f
      MPa", loopcount2+1, i2*cv); /* print what to do next */
      Proc_err(INFO_OPT,text);
      REXPNO( ct + loopcount2 );    /* acquisition */
      SETCURDATA
      ZG
      ssleep(2);
111 END}
112 return o;    /* end of reversibility check */
113 }

```

9.1.2 Pulsprogramm des Drucksprungexperimentes

```

1  #include <Avance.incl>
2  #include <Grad.incl>
3  #include <Delay.incl>
4  "acqto=-p1*2/3.1416"
5  "d8=5u"
6  "d2=200u"
7  1 ze
8  2 30m
9  1u trignl3          ;wait for low level at trigger from p-jump unit
10 1m                  ;1m needed to finish PJU sequence
11 d8 UNBLKGRAD      ;lock off
12 1u setnmr4|13      ;set output trigger high --> init PJU
13 d2                  ;should be 200us / length not important
14 1u setnmr4^13      ; set output trigger low
15 1u trigpl3          ;wait for high level trigger from p-jump unit
16 d5                  ;variable position delay
17 d1
18 p1 phi
19 d8 BLKGRAD          ;lock on
20 go=2 ph31
21 30m mc #0 to 2 Fo(zd)
22 exit
23 phi=0 2 2 0 1 3 1
24 ph31=0 2 2 0 1 3 1

```

Integration der Sequenz zur Synchronisation des Spektrometers mit dem Mikrokontroller der Drucksprungeinrichtung (Zeilen 5, 6, 9-16, 19) in ein standardmäßiges Bruker Pulsprogramm (Bruker Nomenklatur: zg, Avance Version vom 06.11.2009)

9.2 Tetrapeptide

9.2.1 Druckkoeffizienten von Gly₁, Gly₂ und Ala₄

Xxx	δ_o^{HN}			$\delta_o^{\text{H}\alpha}$			$\delta_o^{\text{H}\beta}$
	Gly ₁ [ppm]	Gly ₂ [ppm]	Ala ₄ [ppm]	Gly ₁ [ppm]	Gly ₂ [ppm]	Ala ₄ [ppm]	Ala ₄ [ppm]
Ala	8,46	8,49	8,35	3,94	3,95	4,26	1,40
Arg	8,47	8,53	8,45	3,94	3,96	4,28	1,40
Asn	8,45	8,51	8,40	3,95	3,95	4,27	1,40
Asp	8,45	8,49	8,38	3,95	3,96	4,26	1,41
Cys	8,52	8,46	8,54	3,99	3,95	4,29	1,41
Gln	8,46	8,53	8,46	3,95	3,96	4,27	1,40
Glu	8,51	8,52	8,44	3,96	3,96	4,27	1,40
Gly	8,47	8,57	8,33	3,96	3,98	4,29	1,40
His ^a	8,45	8,48	8,49	3,91	3,93	4,30	1,39
Ile	8,40	8,45	8,49	3,94	3,96	4,28	1,40
Leu	8,46	8,50	8,35	3,93	3,94	4,27	1,40
Lys	8,47	8,51	8,43	3,94	3,95	4,28	1,40
Met	8,46	8,52	8,41	3,94	3,95	4,28	1,40
Phe	8,43	8,49	8,39	3,87	3,91	4,23	1,33
Pro	8,36	8,43	8,50	3,96	3,96	4,28	1,40
Ser	8,46	8,53	8,45	3,95	4,00	4,31	1,41
Thr	8,46	8,53	8,44	3,96	4,02	4,30	1,41
Trp	8,35	8,41	8,15	3,86	3,88	4,15	1,19
Tyr	8,32	8,50	8,39	3,84	3,84	4,23	1,33
Val	8,38	8,38	8,53	3,93	3,94	4,28	1,40
Mittel	8,44	8,49	8,42	3,93	3,95	4,27	1,38

Tabelle 9.1: **Druckkoeffizienten nullter Ordnung δ_o .** Bestimmt aus Gleichung 2.12 der Protonen von Gly₁, Gly₂ und Ala₄ aus Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ bei pH6,7 und einer Temperatur von 283 K. ^aMessung bei pH 8,5.

Xxx	B_1^{HN}			$B_1^{\text{H}\alpha}$			$B_1^{\text{H}\beta}$
	Gly1 [ppm GPa ⁻¹]	Gly2 [ppm GPa ⁻¹]	Ala4 [ppm GPa ⁻¹]	Gly1 [ppm GPa ⁻¹]	Gly2 [ppm GPa ⁻¹]	Ala4 [ppm GPa ⁻¹]	Ala4 [ppm GPa ⁻¹]
Ala	0,09	0,26	0,59	0,09	0,09	-0,04	-0,03
Arg	0,07	0,22	0,53	0,07	0,04	-0,05	-0,04
Asn	0,06	0,18	0,57	0,06	0,07	-0,01	-0,04
Asp	0,10	0,39	0,57	0,05	0,04	-0,01	-0,04
Cys	0,18	0,10	0,54	0,07	0,08	-0,01	-0,03
Gln	0,08	0,16	0,48	0,08	0,07	-0,07	-0,03
Glu	0,22	0,22	0,62	0,07	0,07	-0,05	-0,03
Gly	0,07	0,18	0,52	0,08	0,09	-0,02	-0,03
His ^a	0,08	0,22	0,52	0,08	0,09	-0,05	-0,05
Ile	0,12	0,14	0,66	0,08	0,05	-0,06	-0,02
Leu	0,10	0,27	0,70	0,09	0,07	-0,05	-0,04
Lys	0,12	0,27	0,64	0,09	0,11	-0,04	-0,03
Met	0,08	0,25	0,65	0,08	0,09	-0,05	-0,03
Phe	0,09	0,09	0,62	0,06	0,07	-0,06	-0,03
Pro	0,32	0,11	0,65	0,08	0,08	-0,05	-0,02
Ser	0,11	0,20	0,50	0,08	0,09	-0,03	-0,03
Thr	0,07	0,16	0,61	0,08	0,08	-0,05	-0,03
Trp	0,16	0,21	0,68	0,12	0,06	-0,16	-0,15
Tyr	0,05	0,04	0,68	0,07	0,06	-0,06	-0,03
Val	0,05	0,05	0,60	0,07	0,08	-0,07	-0,02
Mittel	0,11	0,19	0,60	0,08	0,07	-0,05	-0,04

Tabelle 9.2: Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1 . Bestimmt aus Gleichung 2.12 der Protonen von Gly1, Gly2 und Ala4 aus Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ bei pH6,7 und einer Temperatur von 283 K. ^aMessung bei pH 8,5.

Xxx	B_2^{HN}			$B_2^{H\alpha}$			$B_2^{H\beta}$
	Gly1 [ppm GPa ⁻²]	Gly2 [ppm GPa ⁻²]	Ala4 [ppm GPa ⁻²]	Gly1 [ppm GPa ⁻²]	Gly2 [ppm GPa ⁻²]	Ala4 [ppm GPa ⁻²]	Ala4 [ppm GPa ⁻²]
Ala	0,15	-0,15	-0,57	-0,07	-0,10	0,07	0,00
Arg	0,13	0,08	-0,34	-0,03	0,02	0,04	0,03
Asn	0,15	-0,05	-0,48	0,04	-0,07	-0,06	0,04
Asp	0,13	0,38	-0,65	-0,02	0,04	0,01	0,02
Cys	0,10	0,04	-0,58	-0,10	-0,09	-0,07	0,00
Gln	0,10	0,21	-0,14	-0,07	-0,10	0,10	0,00
Glu	-0,02	-0,04	-0,73	-0,07	-0,09	0,04	0,01
Gly	0,13	0,04	-0,46	-0,08	-0,08	0,02	0,01
His ^a	0,10	-0,04	-0,58	-0,08	-0,11	0,05	0,02
Ile	-0,23	-0,05	-0,53	-0,06	0,05	0,03	-0,02
Leu	0,08	-0,11	-0,59	-0,10	-0,08	0,04	0,03
Lys	-0,05	-0,32	-0,49	-0,09	-0,15	0,09	0,00
Met	0,14	-0,09	-0,62	-0,07	-0,05	0,08	0,00
Phe	0,19	-0,21	-0,45	-0,09	-0,08	0,16	0,04
Pro	-0,29	-0,02	-0,67	-0,09	-0,09	0,07	-0,01
Ser	-0,09	-0,07	-0,49	-0,09	-0,08	0,05	0,00
Thr	0,09	0,15	-0,70	-0,08	-0,11	0,04	0,01
Trp	0,05	-0,03	-0,71	-0,17	-0,10	0,08	-0,04
Tyr	0,39	-0,17	-0,69	-0,04	-0,07	0,09	0,04
Val	0,26	0,26	-0,41	-0,05	-0,11	0,06	0,01
Mittel	0,08	-0,01	-0,54	-0,07	-0,07	0,05	0,01

Tabelle 9.3: Druckkoeffizienten zweiter Ordnung B_2 . Bestimmt aus Gleichung 2.12 der Protonen von Gly1, Gly2 und Ala4 aus Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ bei pH6,7 und einer Temperatur von 283 K. ^aMessung bei pH 8,5.